Präparation und Kristallisation des small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein (SGT)

Diplomarbeit
vorgelegt von

Simone Brauns

aus
Helmarshausen

angefertigt
im Institut für Molekulare Strukturbiologie
an der biologischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen
2005

Referrent:	Prof. Dr. R. Ficner
Korreferent:	Prof. Dr. O. Einsle

Tag der Abgabe der Diplomarbeit:	03.02.2005
Letzter Tag der mündlichen Prüfung:	07.05.2004

Ich widme diese Arbeit all jenen, die an mich geglaubt haben,
meinen Eltern, die mir die Welt zeigten und
Thomas, der sie zusammen mit mir durchschreitet.

Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens
endet nicht mit einem Schlußpunkt,
sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse (1877-1962)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den zahlreichen Personen bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ralf Ficner, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte und mich stets bei Problemen unterstützte.

Bei Herrn Dr. Achim Dickmanns möchte ich mich für seine immer währende Gesprächsbereitschaft bedanken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung molekulare Strukturbiologie danke ich für die hervorragende und freundschaftliche Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Winfried Lendeckel, für seine ersten Einweisungen in die Mysterien der Proteinaufreinigung, Frau Dr. Anja Strasser für ihre Einführungen in die kristallographischen Arbeitsmethoden und Herrn Dr. Christos Gouloudis und Frau Johanna Arnorsdottir für die ständige Beantwortung meiner Fragen und ihre unkomplizierte Hilfe.

Des weiteren bedanke ich mich bei meinen Freunden für die Unterstützung und das Verständnis, das sie mir entgegenbrachten und ihre Freundschaft, die mir sehr wichtig ist. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Cathrin Hippel und Herrn Thomas Rolf die mir in unzähligen Gesprächen halfen, meine Gedanken zu sortieren.

Meinen Eltern möchte ich für ihre große Unterstützung und ihr Vertrauen in mich ganz lieb danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	**1**
1.1	Aufbau und Struktur des SGT-Proteins	**3**
1.2	Aufbau und Struktur von TPR-Domänen	**6**
1.3	Funktion von TPR-Domänen	**7**
1.4	Funktionen des SGT-Proteins	**8**
1.4.1	SGT fungiert als ein Cochaperon	**8**
1.4.2	SGT ist ein Bestandteil des synaptischen Chaperon-Komplexes	**11**
1.4.3	Weitere mögliche Funktionen des SGT-Proteins	**12**
1.4.3.1	Interaktion des SGT-Proteins mit dem β amyloid Peptid	**13**
1.4.3.2	Das SGT-Protein interagiert mit dem Wachstumshormon-Rezeptor	**13**
1.4.3.3	Interaktion des SGT-Proteins mit Myostatin	**14**
1.4.3.4	Das SGT-Proteins wird für Zellteilungsprozesse benötigt	**15**
2	Zielsetzung	**16**
3	Material und Methoden	**17**
3.1	Material	**17**
3.1.1	Feinchemikalien	**17**
3.1.2	Größenstandards	**18**
3.1.2.1	DNA-Größenmarker	**18**
3.1.2.2	Protein-Größenstandard	**19**
3.1.3	Enzyme und Inhibitoren	**19**
3.1.4	verwendete Organismen	**20**
3.1.5	Plasmide und Vektoren	**21**
3.1.6	Primer	**21**
3.1.7	Käufliche Reaktionssets (Kits)	**21**
3.1.8	Chromatographiesäulen und Säulenmaterialien	**21**
3.1.9	Antibiotika	**22**
3.1.10	Kristallisationsscreens	**23**
3.1.11	sonstige Materialien	**23**
3.1.12	Geräte	**24**
3.2	Methoden	**26**

3.2.1	Allgemeine Methoden	**26**
3.2.1.1	Mengenbestimmung von Proteinen	**26**
3.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	**26**
3.2.1.3	Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation	**27**
3.2.1.4	Gelelektrophoresen	**27**
3.2.1.4.1	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	**27**
3.2.1.4.2	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	**29**
3.2.1.5	Detektion von Proteinen und Nukleinsäuren	**30**
3.2.1.5.1	Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue	**30**
3.2.1.5.2	Anfärben von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid	**31**
3.2.1.5.3	Proteindetektion durch Western-Blot	**31**
3.2.1.5.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	**33**
3.2.1.5.5	Trocknen von Polyacrylamidgelen	**33**
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	**34**
3.2.2.1	Klonierung der Gensequenz von hSGT in Expressionsvektoren	**34**
3.2.2.1.1	DNA-Amplifizierung durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	**34**
3.2.2.1.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	**36**
3.2.2.1.3	Ligation eines verdauten DNA-Fragments in einen Zielvektor durch DNA-Ligasen	**37**
3.2.2.2	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	**38**
3.2.2.3	Plasmidpräparationen	**39**
3.2.2.3.1	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab	**39**
3.2.2.3.2	Plasmidpräparation im mittleren Maßstab	**39**
3.2.3	Zellbiologische Methoden	**39**
3.2.3.1	Medien zur Aufzucht von *E. coli*	**39**
3.2.3.2	Kultivierung von *E. coli*-Stämmen	**40**
3.2.3.3	Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur	**40**
3.2.3.4	Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*	**40**
3.2.3.4.1	Untersuchung der Condon Usage	**41**
3.2.3.5	Transformationen in Bakterienstämme	**41**
3.2.3.5.1	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen	**41**
3.2.3.5.2	Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen	**42**
3.2.3.6	Überexpression von rekombinanten Proteinen in E. coli	**43**

3.2.3.6.1	Anzucht einer Vorkultur	**43**
3.2.3.6.2	Anzucht einer Expressionskultur	**43**
3.2.3.7	Ernten und Aufschließen von *E. coli*-Zellen	**45**
3.2.4	Biochemische Methoden	**45**
3.2.4.1	Chromatographische Trennmethoden	**45**
3.2.4.1.1	Affinitätschromatographische Trennung von Proteinen mit His-Sequenz über Ni-NTA-Sepharose	**47**
3.2.4.1.2	Affinitätschromatographische Trennung von Proteinen mit GST-Sequenz über Glutathion Sepharose (im Batch Verfahren)	**48**
3.2.4.1.3	Anionenaustauschchromatographie über ResourceQ bzw. MonoQ zur Trennung geladener Proteine	**49**
3.2.4.1.4	Ausschlußchromatographie (Gelchromatographie, Gelfiltration, size exclusion)	**50**
3.2.4.1.4.1	Präparative Ausschlusschromatographie	**50**
3.2.4.1.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	**51**
3.2.4.2	Umpufferung und Entsalzung von Proteinlösungen	**51**
3.2.4.3	Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation	**52**
3.2.4.4	Proteinverdau mit Proteasen	**52**
3.2.5	Kristallisation von Proteinen	**53**
3.2.5.1	Kristallisationsansätze	**53**
3.2.5.2	„Macro-Seeding“ und „Micro-Seeding“ zur Verbesserung von Kristall-wachstum und Kristallordnung	**55**
3.2.5.3	Röntgenbeugungsexperimente	**55**
4	Ergebnisse	**57**
4.1	Umklonierung von hSGT aus pET16b in pET28a und pGEX6P1+1	**57**
4.2	Expression und Aufreinigung des hSGT-Proteins	**60**
4.2.1	Expression und Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins über den pET16b-Expressionsvektor	**61**
4.2.1.1	Überexpression von His-hSGT-Fusionsprotein in *E. coli*	**61**
4.2.1.2	Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein nach Inkubation der Expressionskultur bei 37 °C nach Induktion	**62**
4.2.1.2.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein	**62**

4.2.1.2.2	Anionenaustauschchromatographie über ResourceQ zur Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins nach vorangegangener Affinitätschromatographie	**64**
4.2.1.2.3	Ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins nach vorheriger Affinitätschromatographie	**65**
4.2.1.3	Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein nach Inkubation der Expressionskultur bei 20 °C nach Induktion	**67**
4.2.1.3.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein	**67**
4.2.1.3.2	Ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins nach vorheriger Affinitätschromatographie	**69**
4.2.1.4	Ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins unter Hochsalz-Bedingungen	**70**
4.2.1.5	Versuch zur Spaltung des His-hSGT-Fusionsproteins, durch das Enzym Faktor Xa, in His-Tag und hSGT	**73**
4.2.1.6	Kontrolle des hSGT-His-Tag-Fusionsproteins im Eluat der Ni-NTA-Sepharosesäule mittels Western-Blot	**74**
4.2.2	Expression und Aufreinigung des hSGT-Proteins über den pGEX6P1+1-Expressionsvektor, mit anschließender Abspaltung des GST-Tag mittels PreScission Protease	**74**
4.2.2.1	Überexpression von GST-hSGT-Fusionsprotein in *E. coli* und Affinitätschromatographische Aufreinigung	**75**
4.2.2.2	Ausschlusschromatographische Aufreinigung des hSGT-Proteins	**78**
4.2.2.3	Proteolytische Spaltung des GST-hSGT-Fusionsproteins durch PreScission Protease in hSGT und GST-Tag	**79**
4.2.2.4	Ausschlusschromatographische Aufreinigung des hSGT-Proteins nach vorherigem PreScission Protease-Verdau	**80**
4.3	Kristallisation des hSGT-Proteins und des His-hSGT-Fusions proteins	**82**
4.3.1	Kristallisation des His-hSGT-Fusionsproteins	**83**
4.3.1.1	Kristallisation des oligomerisierten His-hSGT-Fusionsproteins	**83**
4.3.1.2	Kristallisation des dimerisierten His-hSGT-Fusionsproteins	**86**
4.3.2	Kristallisation des hSGT-Proteins	**86**

5	Diskussion	**87**
5.1	Klonierung der hSGT-Gensequenz in den Expressionsvektor pGEX6P1+1	**87**
5.2	Expression und Aufreinigung des hSGT-Proteins	**88**
5.2.1	Oligomerisierungsverhalten des SGT-Proteins	**92**
5.2.2	Oligomerisierungsverhalten des SGT-Proteins nach Hochsalzbehandlung	**93**
5.3	Expression und Aufreinigung des GST-hSGT-Fusionsproteins mit anschließender Spaltung in GST-tag und hSGT-Protein	**94**
5.4	Kristallisation des His-hSGT-Fusionsproteins	**95**
5.5	Kristallisation des hSGT-Proteins	**97**
5.6	Strukturvorhersagen für das hSGT-Protein	**98**
6	Zusammenfassung	**103**
6.1	Ausblick	**104**
6.2	Summary	**106**
7	Literaturverzeichnis	**107**
8	Anhang	**i**
8.1	Daten zum theoretischen pI-Wert und zum Molekulargewicht des hSGT-Proteins	**i**
8.1.1	hSGT-Protein (acession NM_003021)	**i**
8.1.2	hSGT-His-Tag-Fusionsprotein über pET16b aufgereinigt	**i**
8.1.3	hSGT-Protein über pGEX6P1+1 aufgereinigt, GST-Tag mit PreScission Protease entfernt	**i**
8.2	Codon Usage von *E. coli* für das hSGT-Protein	**ii**
8.3	Codon Usage von *E. coli* jedes Codon aus der *hSGT*-Gensequenz	**iii**
8.4	Auswertung für die Kalibrierung der Superdex S200 (10/30)-Säule	**iv**
8.5	Posttranslationale Modifikationsstellen innerhalb des humanen SGT-Proteins	**vi**
8.6	Abkürzungsverzeichnis	**vii**

1 Einleitung

Die Krankheit Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Zivilisationen; jeder zweite Mann und jede dritte Frau erkranken im Laufe ihres Lebens an dieser Krankheit. Bezüglich des Verlusts der Lebensqualität sowie der Mortalitätsrate stellt Krebs sogar eines der schwersten Leiden überhaupt dar. Ein, mit jährlich 4000 bis 5000 allein in Deutschland diagnostizierten neuerkrankten Patienten, recht häufiger und zugleich sehr bösartiger Hirntumor ist das Glioblastom. Der Name dieses Tumors leitet sich von den Stützzellen (Gliazellen) des Gehirns ab, aus denen er entsteht. Glioblastome sind hoch-maligne und sehr schnell wachsende Großhirntumore, die extrem schwer zu therapieren sind. Auch nach radikaler Operation, Chemotherapie oder Bestrahlung tritt meist innerhalb von Monaten ein Rezidiv auf. Obwohl in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden zur Behandlung dieser Krankheit erprobt wurden, beträgt die Überlebenszeit nach der Diagnose im statistischen Mittel nur etwa ein Jahr. Derzeit wird ein neuer Behandlungsansatz erprobt. Durch die Injektion von speziellen Viren (sog. Parvoviren) in den Hirntumor sollen die Krebszellen abgetötet und das Wachstum gestoppt werden.

Parvoviren zählen zu den kleinsten, bis heute bekannten Viren. Sie besitzen eine von einem hüllenlosen Kapsid umgebene einzelsträngige DNA von geringer Komplexität. Da sie nur für wenige regularorische und strukturelle Proteine kodieren, sind sie stark auf Faktoren der Wirtszelle angewiesen (Wrzesinski, 2002 und Apsi, 2002). Obwohl die ersten Parvoviren aus Tumorzellen von Versuchstieren isoliert wurden, stellte sich bald heraus, dass die Viren dort opportunistisch vorliegen und nicht Ursache des Tumors sind (Toolan, 1960 und Toolan, 1967). Autonome Parvoviren, wie das H-1-Virus nutzen transformierte Zellen für ihre Vermehrung und lösen dabei den Tod dieser Zellen aus. Es konnte gezeigt werden, dass Parvoviren Wachstum und Etablierung experimentell induzierter Tumoren hemmen können. (Guetta *et al*., 1986 und Dupressior *et al*., 1989). Sie zeigen in Versuchen mit verschiedenen Karzinomtypen oncosuppressive Aktivität (Herrero Y Calle *et al.*, 2004). Für eine mögliche Behandlung des Glioblastoms wird vor allem das H-1-Virus diskutiert. Der natürliche Wirt des H-1-Virus scheint die Ratte zu sein, aber auch Hamster und menschliche Zelle sind empfänglich. Während es aber nach einer Infektion in Ratten und Hamstern zu schweren Erkrankungen kommen kann, gilt das Virus im Menschen als apathogen (Jacoby *et al*., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das H-1-Virus besonders ausgeprägt in Zellen bösartiger Hirntumore

auftritt, und bereits eine geringe Virendosis ausreicht, die Tumorzellen abzutöten. Warum der H1-Virus Tumorzellen abtöten kann, ist noch nicht geklärt, diese Fähigkeit hängt aber vermutlich mit einem bestimmten viralen Eiweißstoff, dem NS1 Protein, zusammen (Herrero Y Calle *et al*., 2004 und Steiner *et al*., 2004). Das Genom der autonomen Parvoviren kodiert für zwei regulatorische Nicht-Strukturproteine, NS1 und NS2, die essentiell für den viralen Lebenszyklus sind (Cotmore *et al*., 1987). Beides sind Phosphoproteine, die durch alternatives Spleißen aus der selben prä-mRNA entstehen und sich nur hinsichtlich ihres C-Terminus unterscheiden (Cotmore et al., 1986). NS1 ist der wichtigste regulatorische Faktor autonomer Parvoviren und trägt essentiell zur viralen DNA-Replikation, Genexpression und Virus-vermittelte Zytotoxizität bei (Tullis *et al*., 1988). Bei NS1 handelt es sich um ein multifunktionelles Protein. Neben einer DNA-Helikase- und ATPase-Aktivität (Wilson *et al*., 1991) (Nuesch *et al*., 1995), verfügt NS1 über eine strang- und sequenzspezifische Endonukleaseaktivität (Christensen *et al*., 1997 und Cotmore *et al*., 1998).

Zelluläre Proteine, die mit NS1 interagieren, stellen somit auch potentielle Zielmoleküle für die Krebstherapie des Glioblastoms mit Hilfe des autonomen Parvovirus H1 dar.

1998 wurde das SGT-Protein von Cziepluch *et al*. unter zu Hilfenahme eines Yeast-two-hybrid-Systems als Interaktionspartner von NS1 identifiziert (Cziepluch *et al*., 1998). SGT ist eine Abkürzung für small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR) containing protein. An Hand von GST-Pulldown-Assays konnte eine direkte Interaktion von NS1 mit dem SGT-Protein nachgewiesen werden (Kordes *et al*., 1998). Darüberhinaus konnte durch ^{32}P-Markierungs-Experimenten und 2D-Analysen gezeigt werden, dass das SGT-Protein NS1-spezifisch an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird (siehe Anhang 8.5) (Apsi, 2002). Die Phosphorylierung von Proteinen kann auch einen Einfluss auf deren Bindungsfähigkeit an andere Proteine ausüben (Miyata *et al*., 1997). Nach Infektion von Wirtszellen mit autonomen Parvoviren akkumuliert SGT mit NS1 in nukleären Strukturen, die als Orte der viralen Replikation identifiziert wurden und deshalb als APAR-bodies (Autonomous Parvovirus-associated Replication Bodies) bezeichnet werden (Cziepluch *et al*., 2000 und Bashir *et al*., 2001). Während in den meisten Publikationen das Protein als SGT bezeichnet wird, wird in anderen Publikationen die Bezeichnung Ubp verwendet, als Abkürzung für „vp**u** **b**inding **p**rotein“; da es die Möglichkeit besitzt, mit Vpu, einem humanen immun-defizienten, Virus kodiertem Protein, zu interagieren (Callahan *et al*., 1998) (Angeletti *et al*., 2002).

1.1 Aufbau und Struktur des SGT-Proteins

SGT ist ein ubiquitär exprimiertes und evloutionär konserviertes Protein. Nachdem zuerst von Ciepluch *et al.* (1998) eine für SGT-kodierende cDNA aus einer Fibroblasten-cDNA-Bank der Ratte (rSGT) isoliert wurde, konnte bereits kurz darauf die für das humane SGT (hSGT) kodierende cDNA aus einer humanen Plazenta-cDNA Bank isoliert werden. Humane SGT-Transkripte wurden in den verschiedensten menschlichen Geweben gefunden, wie z.B. in Herz, Gehirn, Plazenta, Leber, Niere, Magen und im Skelettmuskel. Das humane SGT-Protein ist auf dem Chromosom 19p13 lokalisiert und besteht aus 313 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa (Kordes et al., 1998).

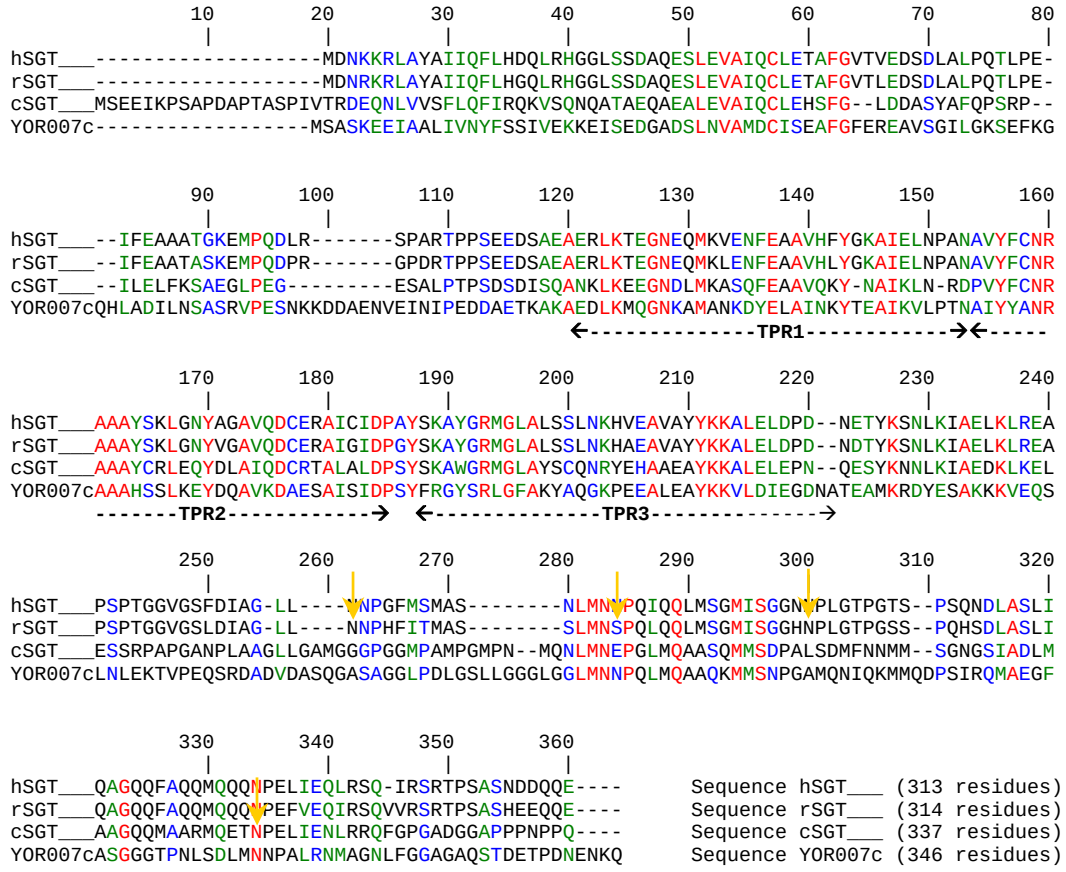


Abb. 1.1: Sequenz-Alignment verschiedener SGT-Proteine vom Menschen (hSGT), Ratten (rSGT) (Ciepluch *et al.*, 1998), *Caenorbabditis elegans* (cSGT) (Wilson, 1994) und *Saccharomyces cerevisiae* (YOR007c) (Sterky *et al.*, 1996)
Wenn die SGT-Sequenz aller vier verschiedenen Spezies identisch ist, wurden die entsprechenden Bereiche innerhalb der Sequenz mit rot farblich markiert. Bereiche mit großer Ähnlichkeit wurden grün hervorgehoben und Bereiche innerhalb der Sequenzen mit geringer Ähnlichkeit wurden blau markiert. Die Positionen der drei TPR-Motive (siehe Abschnitt 1.2) wurde unterhalb der Aminosäure-Sequenzen eingezeichnet. Die vier Positionen der Asparagin-Prolin-Motive wurden überhalb der Aminosäure- Sequenzen mit gelben Pfeilen gekennzeichnet (Tobaban *et al.*, 2003).

Eukaryotische Organismen von Hefen über Nematoden und Fliegen bis hin zu den Säugetieren enthalten Gene, die für das small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing (SGT) Protein codieren. In einem Sequenz-Alignment unterschiedlicher SGT-Proteine (siehe Abbildung 1.1) zeigt sich in der Aminosäuresequenz von rSGT und hSGT eine sehr hohe Homologie von 91 %.

Bei näherer Betrachtung der SGT-Sequenz findet sich eine auspepägte Dreiteilung des Proteins (siehe Abbildung 1.2). Am C-Terminus zeigt das Protein eine Anreicherung mit der Aminosäure Glutamin innerhalb der letzten 50 Aminosäuren. In dieser glutamin-reichen Region besteht die Aminosäuresequenz des SGT-Proteins zu fast 30 % aus Glutamin.

Hier befinden sich auch vier Asparagin-Prolin-Motive (NP-Motive) (Tobaben *et al*., 2003), während sich im Zentrum des Proteins eine Region mit drei TPR-Motiven (**t**etratrico**p**eptide **r**epeat) befindet. Aufbau und Struktur der TPR-Motive werden in Abschnitt 1.2 näher erläutert. Im N-Terminus des SGT-Proteins befindet sich eine mögliche coiled coil Domäne. Tobaben *et al*. postulierten 2003, daß der N-Terminus des SGT-Proteins sowohl Homo- als auch Hetero-Oligomerisationen des Proteins vermitteln kann. Diese Region des Proteins beinhaltet einen stark konservierten Bereich von Aminosäuren, von dem zunächst angenommen wurde, er würde ein viertes TPR-Motiv formen, aber dieses vierte TPR-Motiv ist offensichtlich nicht konserviert. Die Aminosäuresequenz innerhalb des N-Terminus des SGT-Proteins ist aber anscheinend bestrebt eine sogenannte coiled coil-Domäne zu bilden, welches ein bekanntes Dimerisations-Motiv darstellt. Verschiedene SGT-Proteine können ebenso effizient heterotypisch miteinander interagieren, wie sie auch homotypische Dimere ausbilden können (Tobaben *et al*., 2003).

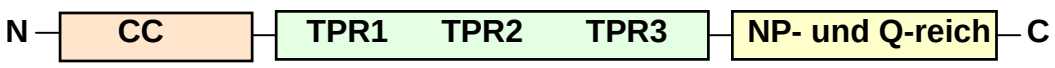


Abb. 1.2: Schematischer Überblick über die einzelnen Domänen des SGT-Proteins
Im N-Terminus ist eine mögliche coiled coil Domäne (CC) eingezeichnet. Die drei TPR-Motive der TPR-Domäne finden sich in der Mitte des Proteins, und am C-Terminus findet sich eine glutamin-reiche Domäne innerhalb derer sich auch vier Asparagin-Prolin-Motive (NP-Motive) befinden.

Nach Tobabaen *et al*., 2002

Für einen genaueren Überblick über die Sekundärstruktur des hSGT-Proteins, wurde dessen Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms PSIpredict untersucht.

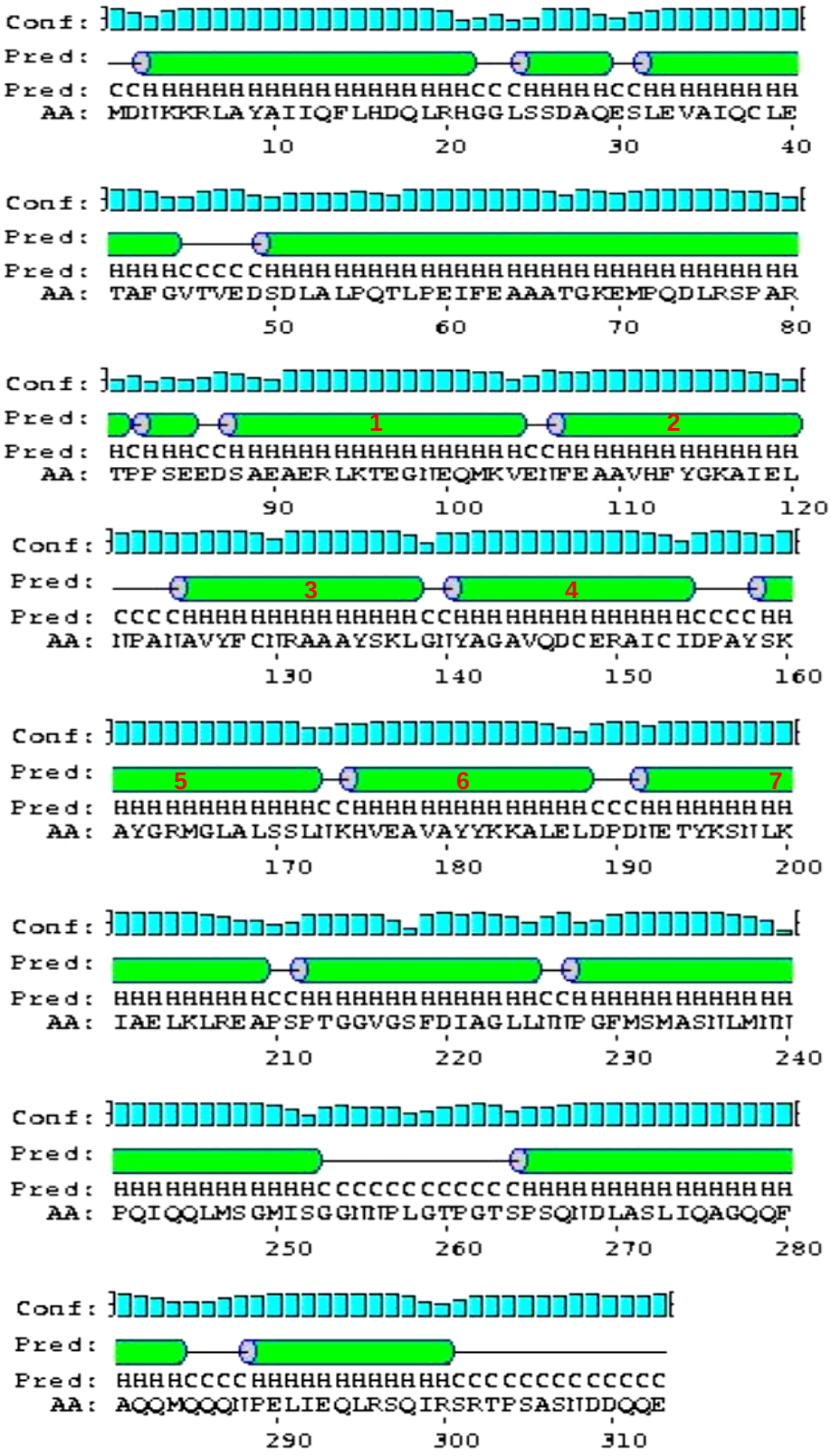


Abb. 1.3: Sekundärstrukturvorhersage für das humane SGT-Protein
Durch die Sekundärstrukturvoraussage durch das Programm PSIpredict zeigt sich deutlich das massive Auftreten von α-Helices (grüne Zylinder) innerhalb der SGT-Sequenz. Insgesamt sagt PSIpredict sechtzehn α-Helices für das SGT-Protein voraus. Die sieben α-Helices der TPR-Domäne wurden mit roten Zahlen markiert, und die Höhe der blau gefärbten Balken über den einzelnen Aminosäuren gibt die Konfidenz (Vertrauen) der Vorhersage wider. C = Coil; H = Helix

Bei genauerer Betrachtung der Sekundärstrukturvorhersage (siehe Abbildung 1.3) zeigt sich deutlich das verstärkte Vorkommen von α-helicalen Strukturen.

1.2 Aufbau und Struktur von TPR-Domänen

TPR (tetratricopeptide repeat)-Motive sind Sequenzabschnitte mit einer degenerierten Konsensussequenz aus 34 Aminosäuren (von denen einige konserviert sind), die in mehreren Wiederholungen aufeinander abfolgen können (Goebl *et al*., 1991). Sie bilden amphiphatische Helices aus, die aber meist als Helix-turn-Helix-Motiv, welche aus 2 aniparallelen α-Helices bestehen, vorliegen. Mehrere hintereinander liegende TPR-Motive können eine TPR-Domäne formen wobei diese Domänen aus 3-16 Wiederholungen dieser 34 Aminosäurereste bestehen und ein komplett helicales strukturelles Motiv ausbilden (Sikorsky *et al*., 1990). Diese, die gesamte TPR-Domäne umspannende superhelicale Architektur, stammt aus der parallelen Aufschichtung der zwei α-Helices jedes einzelnen TPR-Motivs (siehe Abbildung 1.4).

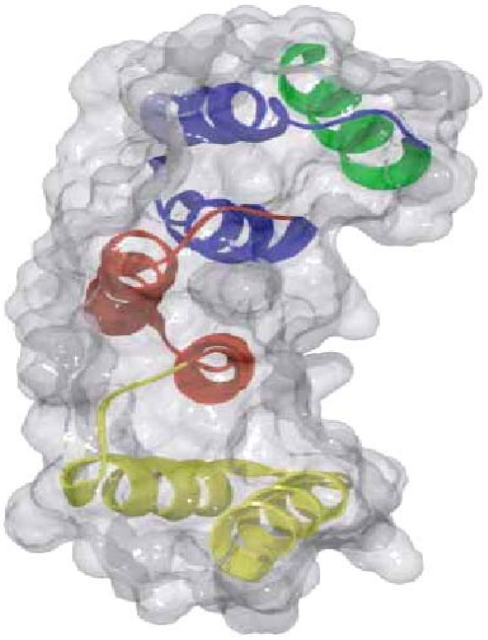


Abb. 1.4: Struktur der TPR-1-Domäne des HOP-Proteins
HOP ist ein Akronym und steht für „Hsp70 and Hsp90-organizing protein". Die TPR-1-Domäne des HOP-Proteins zeigt eine große Sequenzähnlichkeit zu der TPR-Domäne des SGT-Proteins. Das Bild zeigt die molekulare Oberfläche von TPR-1 in grau, wobei im Inneren die Proteinkette als gefaltetes Band zu erkennen ist. Das gesamte Molekül erinnert von seiner drei-dimensionalen Struktur an eine Wendeltreppe, wobei die einzelnen TPR-Motive aus jeweils zwei α-Helices bestehen, und die Treppenstufen dieser gedachten Wendeltreppe darstellen. Das erste TPR-Motiv ist gelb eingefärbt, das zweite wurde rot markiert und das dritte und letzte TPR-Motiv ist in blau zu sehen. Die grüne Helix am Ende stellt eine „Solvating" Helix dar.

Das Bild stammt aus: Main *et al*., 2003: Design of Stable α-Helical Array from an Idealized TPR Motif

Die konsequente räumliche Anordnung der amphiphatischen α-Helices resultiert in einer rechtsdrehenden superhelicalen Struktur, welche eine amphiphatische Furche ausbildet. Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Furche am Mechanismus der Proteinerkennung beteiligt ist (Das *et al*., 1998).

In NMR-Untersuchungen der TPR-Domäne des hSGT-Proteins zeigte sich, dass diese Domäne aus sieben α-Helices besteht, die lokalisiert sind von Glu92-Lys103 (Helix 1), Phe107-Glu119 (Helix 2), Ala125-Lys137 (Helix 3), Tyr141-Ile154 (Helix 4), Ser159-Ser171 (Helix 5), His175-Leu186 (Helix6) und schließlich Glu193-Lys205 (Helix 7) (Pai *et al*., 2003). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Sekundärstruktur-Voraussagen für das hSGT-Protein über das Programm PSIpredict wieder (siehe Abbildung 1.3).

1.3 Funktion von TPR-Domänen

TPR-enthaltende Proteine sind in ein breites Spektrum zellulärer Funktionen involviert, wie z.B. der Zellzyklus-Kontrolle, Transkription und Splicing, dem Proteintransport, der Regulation der Protein-Phosphorylierung und explizit auch der Proteinfaltung (Blatch *et al*., 1999).

Die wohl wichtigsten Eigenschaften von TPR-Domänen sind in ihrer Beteiligung bei Protein-Interaktionen, der Zusammenlagerung von Multiprotein-Komplexen und im Protein-Targetingmechanismus von Mitochondrien und Peroxisomen zu sehen (Das *et al*., 1998).

Das TPR-Motiv wurde 1990 von Hirano *et al*. als essentieller Bestandteil des nuc2+ Proteins in *S. pombe* identifiziert. Zeitgleich identifizierten Sikorski *et al*. in dem Genprodukt von Cdc23 (cell division cycle proteins, Cdc) aus *S. cerevisiae* auch ein TPR-Motiv. TPR-Motive wurden in über 300 verschiedenen Proteinen gefunden, welche mit einer großen Bandbreite biologischer Funktionen assoziiert sind. Eine Analyse prokaryotischer und eukaryotischer TPR-Domänen lassen weder einen signifikanten Unterschied in der Verwendung der einzelnen Aminosäuren, noch in der Konsensussequenz selbst erkennen.

Bis Heute wurde allerdings noch keine Sequenz einer prokaryotischen TPR-Domäne aufgeklärt (D'Andrea *et al*., 2003).

1.4 Funktionen des SGT-Proteins

Da SGT ubiquitär exprimiert wird, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei dem SGT-Protein um ein Housekeeping-Protein handeln könnte. Konträr dazu zeigen sgt-Knock out-Mutanten von *S. cervisiae* allerdings keine phänotypischen Veränderungen beim Wachstum auf verschiedenen kohlenstoffhaltigen Medien (Apsi, 2002). Betrachtet man die große Homologie der TPR-Domäne des SGT-Proteins mit der TPR-1-Domäne des Hsp70 and Hsp90-organizing protein (HOP), drängt sich die Vermutung auf, dass auch das SGT-Protein ebenso wie HOP eine Rolle als Cochaperon spielt (Scheufler *et al*., 2000) (siehe Abschnitt 1.4.1).

1.4.1 SGT fungiert als ein Cochaperon

Nach wie vor ist die Bedeutung der glutamin-reichen Domäne am C-Terminus des SGT-Proteins nicht bekannt. Auch die Bedeutung der vier Asparagin-Prolin-Motive (NP-Motive, im Ein-Buchstaben-Code) ist nicht vollstängig verstanden.
1999 fanden Liu *et al.* heraus, dass das SGT-Protein mit dem Hitze-Schock verwandten Protein Hsc70 interagiert. Hitze Schock-Proteine sind eine Reihe von in der Natur stark konservierten Proteinen, deren Expression sehr stark durch Hitzestress induziert wird. Hitzeschock-Proteine gehören zur Familie der molekularen Chaperone. Diese können an Polypeptidketten binden und dabei z.B. die unspezifische Aggregation schwach bindender Seitenketten verhindern. Sie erleichtern die Faltung anderer Proteine, können aber auch bei der Anordnung mehrerer Polypeptide zu größeren Strukturkomplexen helfen (Lehninger *et al*., 1994).
Die Untersuchung molekularer Mechanismen von Chaperonen nimmt seit einigen Jahren einen immer größer werdenden Stellenwert in der medizinischen Forschung ein, denn ein gemeinsames Merkmal der meisten neurodegenerativen Krankheiten ist die Bildung von Proteinaggregaten in Nervenzellen. Im gesunden Organismus verhindern molekulare Chaperone eine falsche Proteinfaltung, die zu einer Aggregatbildung dieser Proteine, durch die Oberflächenexposition hydrophober Reste führen kann. Ein Beispiel hierfür ist die Krankheit Chorea Huntington. Bei dieser erblichen Erkrankung des Gehirns unterdrücken Chaperone lange Jahre die Verklumpung krank machender Proteine. Tritt ein Ungleichgewicht zwischen Chaperonkapazität und der Bildung der

verklumpungsanfälligen Eiweiße auf, bricht die Krankheit schließlich aus (Sittler *et al*., 2001).

Die Chaperonfunktion der Hitze-Schock-Proteine ist ein essentieller Teil des Abwehrmechanismus der Zelle gegen proteotoxischen Stress. Da die korrekte Faltung von Proteinen aber auch in Abwesenheit von Stress für die Zelle überlebenswichtig ist, werden Hitze-Shock ähnliche Isoformen auch unter nicht-Stress-Bedingungen gebildet. Diese werden nicht HSP sondern HSC (eine Abkürzung für heat shock cognate (verwandte) protein) genannt.

Hitze-Shock-Proteine erfüllen in der Zelle auch unter physiologischen Bedingungen wichtige Aufgaben bei der Synthese, der Faltung und dem Transport von Proteinen (Hartl *et al*., 2002). Unterschieden werden die Hitze-Shock-Proteine an Hand ihres Molekulargewichtes.

Die Hsc70-Familie nimmt unter den Hitzeschock-verwandten Proteinen eine herausragende Stellung ein, denn man kann sie in nahezu allen Organismen und in allen zellulären Kompartimenten finden (Feige *et al*., 1994). Das Hsc70-Protein wird in den Zellen konstitutiv exprimiert, und kann bis zu 1 % aller cytoplasmatischen Proteine ausmachen.

Die Fähigkeit von Hsc70 an Proteine zu binden ist ATP-abhängig, wobei die Bindung von Substrat durch Cochaperone gesteigert werden kann. Auch die Ablösung des Substrates ist ATP-abhängig und kann durch Cochaperone unterstützt werden (Hohfeld *et al*., 1995). Bei den Hitzeschock-Proteinen, sowie auch dem Hsc70 bestimmen die jeweiligen Partnermoleküle die genaue Art der Funktion des Komplexes. HIP (Hsc70 interacting protein) und HOP (Hsp70 and Hsp90-organizing protein) sind gebunden, wenn es um die Proteinfaltung geht. CHIP (C-terminus of the Hsc70-interacting protein) dagegen ist an das Hsc70-Protein gebunden, wenn es um den Abbau von Proteinen geht (Hohfeld *et al*., 2001).

Chaperone assistieren also nicht nur bei der Proteinfaltung während der Neusynthese naszierender Polypeptidketten, sondern auch bei der Erkennung denaturierter Proteine. Sie identifizieren die missgefalteten Proteine und helfen bei deren Faltung, oder sie machen sie der Proteolyse zugänglich.

Die Funktionen von Hsc70 im Cytosol sind vielfältig. Neben den bisher beschriebenen Beteiligungen an der Faltung und Degradation von Proteinen spielt es auch noch eine Rolle bei Transportprozessen von Proteinen in die Mitochondrien (Stuart *et al*., 1994), und es ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Helmbrecht *et al*., 2000).

Die Struktur des Hsc70-Proteins läßt sich in drei funktionelle Bereiche einteilen (siehe Abbildung 1.4):

- Zum einen die hochkonservierte N-terminale ATPase-Domäne,
- in der Mitte des Proteins ein konservierter Bereich mit der hydrophoben Substrat-Bindestelle,
- und der wenig konservierte C-Terminus der für eine Wechselwirkung mit einigen Cochaperonen, z.B. dem DnaJ, verantwortlich ist (Cyr *et al*., 1994).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch die carboxy-terminale Domäne in die Substratbindung involviert ist (Demand *et al*., 1998).

Es scheint so zu sein, dass sowohl das Hsp70- als auch das Hsc70-Protein nicht selbst aktiv Konformationsänderungen von Proteinen induzieren, sondern vielmehr als Akzeptor für andere Proteine dienen, welche anschließend die eigentliche Faltung bzw. Degradation durchführen (Hartl *et al*., 2002) (siehe Abbildung 1.5).

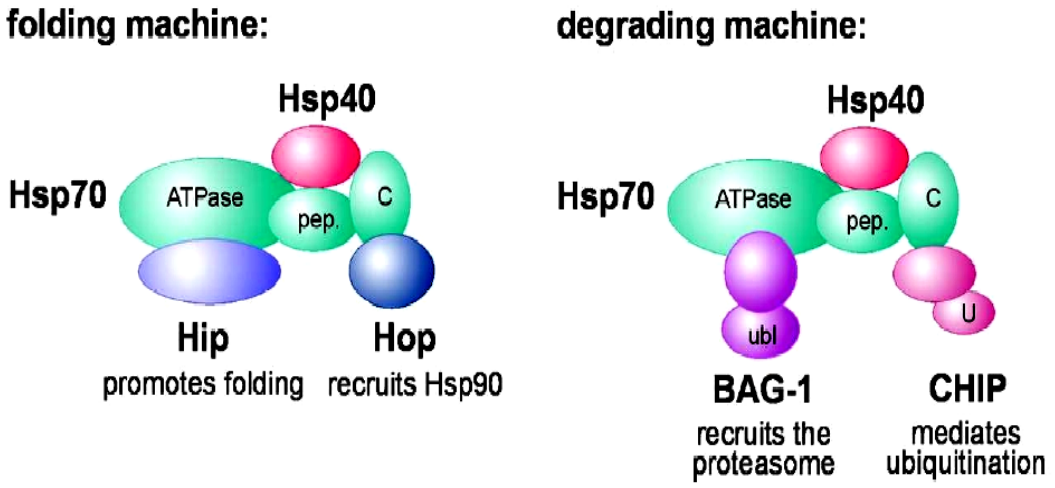


Abb. 1.5: Kofaktoren konkurrieren um die Bindungsstellen am Hsp70-Protein und bestimmen somit seine Funktion
Das Hsp70-Protein ist grün eingefärbt. Deutlich ist die Dreiteilung des Proteins in ATPase-Domäne, Substrat-Bindestelle für Peptide und carboxy-terminale Domäne für die Wechselwirkung mit verschiedenen Cochaperonen zu erkennen.

Das Bild stammt aus der Genetik-Vorlesung (2004) von Herrn Langer, Uni Köln

Um die Faltung von Proteinen durchzuführen, kann Hsc70 mit einer großen Anzahl verschiederer Kofaktoren kooperieren, die alle eine sogenannte tricopetide repeat (TPR)-Domäne beinhalten (Brinker *et al*., 2002). Das Hsp70 and Hsp90-organizing protein (HOP) z.B. besteht fast ausschließlich aus TPR-Motiven, neun Stück an der

Zahl, die sich zu zwei TPR-Domänen zusammenschließen. Dennoch besitzt es keine Chaperonfunktion an sich, es vermittelt vielmehr den Substratübergang von Hsp70 auf Hsp90, an welche beiden es sich über seine TPR-Motive bindet (Scheufler et al., 2000) (Honore *et al*., 1992). Interessanterweise sind bei Hsp70 und bei Hsp90 die letzten vier Aminosäuren identisch (EEVD). Wu *et al*. fanden 2001 in Untersuchungen heraus, dass diese vier Aminosäuren eine große Rolle bei der Interaktion der beiden Proteine mit TPR-Motiven enthaltenden Proteine spielen. Sie stellten hsc70-Mutanten mit Aminosäuresubstitutionen im C-Terminus her und verglichen in Co-Präzipitationsversuchen die Bindungsfähigkeiten von Hsc70 und Hsc70 (ΔEEVD) an die TPR-enthaltenden Proteine TPR1, HOP, CHIP und hSGT.

Liu *et al*. (1999) konnten nachweisen, daß die Tetratricopeptid-Domäne des hSGT-Proteins mit dem C-Terminus von Hsc70 interagiert. Während dieser Interaktion ist das SGT-Protein in der Lage, die Fähigkeit von Hsc70 mißgefaltete Proteine wiederherzustellen, zu inhibieren (Wu *et al*., 2001). Eine Entfernung der TPR-flankierenden Regionen hat keinen Einfluß auf die Fähigkeit einiger Proteine, mit dem Hsc70-Protein zu interagieren. Diese Proteine, zu denen auch das hSGT-Protein gehört, wurden zu einer Klasse (TPR proteins Class I) zusammengefasst (van der Spuy *et al*., 2000).

1.4.2 SGT ist ein Bestandteil des synaptischen Chaperon-Komplexes

Im Jahr 2001 wurde von Tobaben *et al*. ein synaptischer Chaperon-Komplex vorgestellt, der aus den drei Proteinen Hsc70, SGT und dem synaptic vesicle cysteine string protein (in der Kurzform: CSP) besteht. CSP ist ein typischer Vertreter aus der Familie der DnaJ-Proteine. Es fungiert als ein präsynaptisches Cochaperon während der Neurotransmission an den Synapsen und kann sehr stark die ATPase des Hsc70-Proteins aktivieren. CSP formt mit SGT und Hsc70 einen ADP-abhängigen Dreierkomplex auf den synaptischen Vesikeln, welcher durch ATP aufgelöst werden kann.

CSP bindet über seine DnaJ-Domäne im N-Terminus an das Hsc70-Protein. Das charakteristische Merkmal aller zu DnaJ homologen Proteine ist die 70 AS umfassende J-Domäne. Sie besteht aus vier α-Helices, wobei zwischen Helix II und Helix III das

hochkonservierte Tripeptid HPD exponiert wird. Dieses Tripeptid ist essentiell für die Interaktion zwischen DnaJ-ähnlichen Proteinen und Proteinen aus der Hsc70-Familie.
Während bei einer Mutation innerhalb der kompakten Helix-turn-Helix-Struktur das DnaJ-Protein noch eingeschränkt funtionsfähig ist, verliert es bei einer Mutation im HPD-Tripeptid seine Fähigkeit an Hsc70 zu binden (Tsai *et al*., 1996) (Chamberlain *et al*., 1997). In der Mitte des CSP befindet sich eine cystein-reiche Domäne, die palmitoyliert ist, und dadurch das Protein an den synaptischen Vesikeln verankert (Mastrogiacomo *et al*., 1994). Neben den synaptischen Vesikeln ist es auch noch mit sekretorischne Granula verschiedener Zelltypen assoziiert. Für die regulierte Sekretion ist nur ein Komplex aus CSP und Hsc70 nötig, das SGT-Protein spiel hierbei keine Rolle (Gareth *et al*., 2003).
Für die Interaktion mit Hsc70 in dem Dreierkomplex sind einige basische Reste in der zentralen TPR-Domäne von SGT verantwortlich. Aber es bindet nicht nur an den C-Terminus von Hsc70 sondern über die TPR-Domäne auch an das cysteine string protein (CSP). Außerhalb der TPR-Domäne mangelt es dem SGT-Protein an möglichen Motiven für die Interaktion mit anderen Proteinen. In Yeast-two-hybrid-Screens wurde das SGT-Protein als Interaktionspartner für das CSP gefunden. Kurz darauf fand man den oben vorgestellten Dreierkomplex auf synaptischen Vesikeln. In diesem Zusammenhang postulierten Tobaban *et al*. (2003) eine überarbeitete modulare Organisation des SGT-Proteins, in der der N-Terminus für die Homo- und Hetero-Oligomerisation des Proteins verantwortlich ist, die TPR-Domäne für die Interationen mit den beiden Proteinen Hsc70 und CSP, und der C-Terminus ein unabhängiges Interaktions-Modul für potentielle Bindungpartner darstellt.

1.4.3 Weitere mögliche Funktionen des SGT-Proteins

In den letzten Jahren verstärkte sich die Forschung über das small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing Protein. Dennoch ist erst recht wenig über den genauen Aufbau und die dreidimensionale Struktur des Proteins bekannt. Bisher sind auch erst wenige biologische Funktionen des SGT-Proteins entschlüsselt. Einige dieser neu entdeckten Funktionen des SGT-Proteins werden in den nächsten Kapiteln kurz erläutert werden.

1.4.3.1 Interaktion des SGT-Proteins mit dem β amyloid Peptid

Amyloid beschreibt eine Gruppe von Proteinaggregaten, die unter einem Mikroskop betrachtet spezifische Merkmale teilen. Der Name Amyloid ist etwas irreführend. Er stammt aus der Identifikation der Proteingruppe mit Hilfe einer Iod-Färbung, daher der Name (lateinisch = Stärke). Erst später erkannte man die Gruppe der Amyloide als Proteine.

Amyloide spielen eine gewichtige Rolle bei einigen genetischen Erkrankungen wie z.B. der Chorea Huntington Krankheit (siehe Abschnitt 1.4.1). Wenngleich auch noch nicht verstanden ist, ob die Amyloidaggregate nun der Auslöser der Krankheit sind, oder ob sie nur ein weiteres Symptom im Krankheitsverlauf darstellen.

Fonte *et al*. fanden 2002 heraus, daß eine Inhibierung des SGT-Proteins in einer Verringerung der Toxizität durch das β amyloid Peptid resultiert. Dies weist darauf hin, daß Chaperone ein Rolle bei der Regulation des β amyloid Peptid-Metabolismus und dessen Toxizität spielen könnten.

1.4.3.2 Das SGT-Protein interagiert mit dem Wachstumshormon-Rezeptor

Die Endozytose ist ein für die Zelle wichtiger Mechanismus, mit dem sie durch Einstülpung und Abschnürung der Plasmamembran Nähr-und Botenstoffe aufnehmen kann. Die so entstehenden endozytotischen Transportvesikel verschmelzen anschließend mit endosomalen Kompartimenten.

Im Vergleich zur Endozytose werden bei der Exozytose, durch Verschmelzung von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran, Proteine und Lipide in die Plasmamembran eingebaut. Diese können durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen und durch erneuten Einbau in neue sekretorische Vesikel wiederverwendet werden. Hierfür schnüren sich zuerst intrazelluläre Transportvesikel (ITV) von der Plasmamembran ins Zellinnere ab und fusionieren anschließend mit einem frühen Endosom, in dem der Vesikelinhalt und die Membranbestandteile sortiert werden.

Das Recycling zur Plasmamembran erfolgt vom frühen Endosom über ein Recycling-Endosom. Zur Degradation werden die Substanzen über ein spätes Endosom zum Lysosom transportiert (Stryer, 1994).

Das Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) wird in der Hypophyse hergestellt, freigesetzt und reguliert z.B. den Wasserhaushalt, die Kohlenhydrat-Konzentration und die Eiweiß-Bilanz. Die Aktivität von GH hängt aber nicht nur von der Anwesenheit des Hormons ab, sondern auch von der Verfügbarkeit seines Rezeptors (Schantl *et al*., 2003).

Die Endozytose des growth hormone receptor (GHR) wird von dem ubiquitin-conjugating System, einem cytosolischem zehn Aminosäure großem Motiv, dem ubiquitin-dependent endocytosis (UbE)-Motiv, reguliert. Schantl et al. fanden 2003 heraus, daß sowohl der Vorläufer als auch die endgültige Form des Rezeptors, mit dem SGT-Protein interagieren.

Diese Interaktion des SGT-Proteins mit dem UbE-Motiv wird von dem ersten TPR-Motiv des small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein vermittelt, und ist unabhängig von einer Ubiquitin-Konjugation (Schantl *et al*., 2003)

1.4.3.3 Interaktion des SGT-Proteins mit Myostatin

Myostatin gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die bei der Regulation des Zellwachstums eine Rolle spielen (sogenannte TGF = transforming growth factor Proteine). Es wird in den Muskelzellen gebildet und begrenzt deren Wachstum. Die Differenzierung von Satellitenzellen in der Skelettmuskulatur zu Muskelzellen wird durch Myostatin gehemmt (Carlson *et al*., 1999).

Unter Zuhilfenahme eines Yeast-two-hybrid-Systems wurde hSGT als Myostatin-assoziiertes Protein identifiziert und die Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde anschließend durch Pull-down-Assays bestätigt. Für diese Interaktion ist die N-terminale Region des Myostatin-Proteins und die C-terminale Domäne (von Aminosäure 158-313) des SGT-Proteins nötig. Innerhalb dieser Sequenz befindet sich auch das dritte und damit letzte TPR-Motiv von SGT. Der C-Terminus ohne das dritte TPR-Motiv besitzt nicht die Möglichkeit mit dem Myostatin-Protein zu interagieren.

Das small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing Protein spielt sowohl bei der Vermittlung der Myostatin-Sekretion eine große Rolle, als auch bei der Aktivierung der Skelettmuskel-Zellen während der Myogenese (Wang *et al*., 2003).

1.4.3.4 Das SGT-Proteins wird für Zellteilungsprozesse benötigt

Eukaryotische Organismen von Hefen über Nematoden bis zu den Säugetieren enthalten das small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing (SGT) Protein. Da TRP-Domänen zuallererst als Protein-Interaktionsdomänen von Zellzyklus-Proteinen (cell division cycle proteins, Cdc) beschrieben wurden (Hirano *et al*., 19990), lag die Vermutung nahe, dass auch SGT-Proteine in diese Funktionen involviert sein könnten.
Untersuchungen zur Lokalisation des hSGT-Proteins in den Zellen zeigten eine Akkumulation dieses Proteins in Strukturen, welche für die Zellteilung relevant sind wie z.B. in der Mittelzone oder an dem Mittelkörper des Spindelapparates (Winnefeld *et al*., 2003)
Bei der Untersuchung von SGT-Knock-down Populationen stellte sich heraus, dass eine drastische Verringerung des hSGT-Proteins zu einer Reduzierung der Zellteilung führt. Zellen dieser Knock-down-Populationen sind nicht in der Lage die Zellteilung zu vervollständigen. Dies wird durch einen mitotischen Arrest ausgelöst, deren Folge der Zelltod ist.

2 Zielsetzung der Arbeit

Eine häufig auftretende und bis heute noch nahezu unheilbare Tumorerkrankung ist das Glioblastom. Trotz intensiver Forschung gibt es nur wenige Fortschritte in der Behandlung dieses malignen Großhirntumors. Derzeit wird ein neuer Behandlungsansatz erforscht, bei dem Tumorzellen durch Injektion von Parvoviren abgetötet werden sollen. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Parvoviren Wachstum und Etablierung experimentell induzierter Tumoren hemmen können. (Guetta *et al*., 1986 und Dupressior *et al*., 1989). Warum Parvoviren in der Lage sind Tumorzellen abzutöten, ist noch nicht geklärt, vermutlich hängt diese Fähigkeit aber mit einem bestimmten viralen Eiweißstoff, dem Nicht-Strukturprotein 1 (NS1), zusammen (Herrero Y Calle *et al*., 2004 und Steiner *et al*., 2004). NS1 ist der wichtigste regulatorische Faktor autonomer Parvoviren und trägt essentiell zur viralen DNA-Replikation, Genexpression und Virus-vermittelte Zytotoxizität bei (Tullis *et al*., 1988). Zelluläre Proteine, die mit NS1 interagieren, stellen somit auch potentielle Zielmoleküle für die Krebstherapie des Glioblastoms mit Hilfe autonomer Parvoviren dar.

1998 wurde das SGT-Protein von Cziepluch *et al*. unter zu Hilfenahme eines Yeast-two-hybrid-Systems als Interaktionspartner von NS1 identifiziert (Cziepluch *et al*., 1998). SGT ist eine Abkürzung für small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR) containing Protein. An Hand von GST-Pulldown-Assays konnte eine direkte Interaktion von NS1 mit dem SGT-Protein nachgewiesen werden (Kordes *et al*., 1998).

SGT ist ein ubiquitär exprimiertes und evloutionär konserviertes Protein. Seit 1998, als Cziepluch *et al*. eine SGT-kodierende cDNA aus einer Fibroblasten-cDNA-Bank der Ratte isolierten, wurden bereits einige Interaktionspartner des SGT-Proteins identifiziert, dennoch blieben viele Fragen zur Funktionsweise des Proteins offen.

Ein wichtiger Schritt bei der Untersuchung des SGT-Proteins, welcher gleichzeitig zur Aufklärung molekularer Mechanismen beitragen kann, ist die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur. Das Ziel dieser Arbeit bestand zuallererst in der Etablierung einer geeigneten Expressions- und Aufreinigungsstrategie, für das humane SGT-Protein in *E. coli*. Das Protein sollte in ausreichender Menge und möglichst frei von Kontaminationen durch Fremdprotein hergestellt werden können. Zum Erhalt einer dreidimensionalen Struktur des SGT-Proteins, sollten Kristallisationsversuche durchgeführt werden, um anschließend mittels Röntgenbeugungsexperimenten Daten für die Strukturaufklärung zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Feinchemikalien

Standardchemikalien, organische Substanzen und Lösungsmittel wurden von verschiedenen Firmen bezogen und besitzen den Reinheitsgrad „pro analysis“ oder „reinst“.

Acrylamid/Bisacrylamid-Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO-Ultra	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulphat	Roth, Karlsruhe
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie Brillant Blue G250 / R250	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiniumhydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) dioxanfrei	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumformiat	Fluka, Buchs

di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (Skim milk powder)	Fluka, Buchs
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumformiat	Merck, Darmstadt
Nickelsulphat Hexahydrat	Fluka, Buchs
Polyethylenglykol 200, 300, 400, 600, 1000, 3000, 6000, 10000	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 1500, 2000, 4000, 5000, 8000, 20000	Fluka, Buchs
Polyethylenglykol 3350	Sigma-Aldrich, Steinheim
pH-Pufferlösungen pH 4,01, 7,0, 9,21	Mettler-Toledo, Steinbach
Protein Assay Bradford Reagens	BioRad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche, Schweiz
Salzsäure 37 %	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulphat) Ultrapure	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Yeast-Extract	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England

3.1.2 Größenstandards

3.1.2.1 DNA-Größenmarker

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel Elektrophorese wurde der Gene Ruler 1 kb Ladder (MBI, Fermentas) eingesetzt (siehe Abb. 3.1).

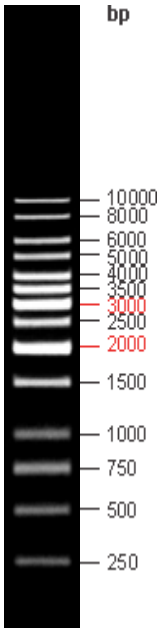


Abb. 3.1: Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder

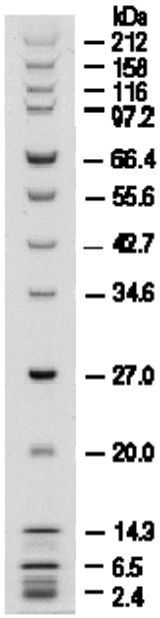


Abb. 3.2: NEB Protein Marker broad range

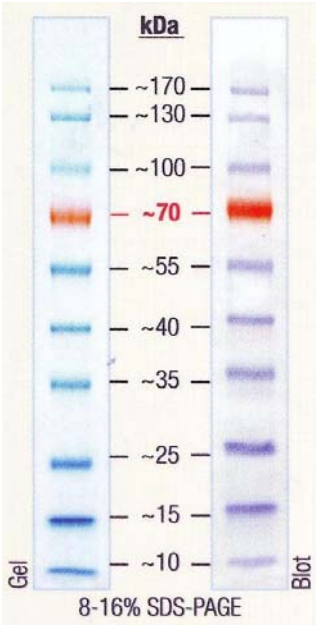


Abb. 3.3: PageRuler prestained Protein Ladder

3.1.2.2 Protein-Größenstandard

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der rekombinanten Proteine mittels SDS-Page wurde der Protein Größenstandard Broad Range (BR) von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) (siehe Abb. 3.2), der sebst hergestellte SM-Marker (Self Made Marker) und der PageRuler^{TM} Prestained Protein Ladder (MBI, Fermentas) verwendet (siehe Abb. 3.3).

3.1.3 Enzyme und Inhibitoren

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTP Set	Fermentas, St. Leon - Rot
Lysozym	Roche, Mannheim
*Nde*I, *Sal*I, *Xho*I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T7 RNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq-Polymerase	Uni Göttingen (Eigenproduktion)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete EDTA-free	Roche, Mannheim

3.1.4 verwendete Organismen

Als Klonierungsstämme wurden die Stämme *E. coli* DH 5α, XL1-Blue und XL10-Gold, für die Expressionen wurden die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP und BL21 (DE3) Rosetta 2 verwendet.

E. coli-Stamm	**Genotyp**	**Referenz / Quelle**
BL21 (DE3)	*E. coli* B F- *dcm ompT hsdS*(r_B- m_B-) *gal λ* (DE3)	Stratagene La Jolla, USA
BL21 (DE3) RIL	*E. coli B F- ompT hsdS (r_B- m_B-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileYleuW Camr]*	Stratagene La Jolla, USA
BL21 (DE3) RP	*E. coli B F– ompT hsdS (r_B–m_B) dcm+ Tet gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam]*	Stratagene La Jolla, USA
BL21 (DE3) Rosetta 2	E. coli B F- ompT hsdSB (rb- mB-) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE6 (CmR)	Novagene Madison, USA
DH 5α	[*endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^-$), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA(*Nal^r*)*, *relA1*, Δ*(lacZYA-argF)*U169, Φ*80lacZ*Δ*M15*]	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F′ *proAB lacI*qZΔ*M15* Tn*10* (Tetr)]	Stratagene La Jolla, USA
XL10-Gold	*Tet (mcrA)183 (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F proAB lacI Z M15 Tn10 (Tet) Amy Cam]*	Stratagene La Jolla, USA

3.1.5 Plasmide und Vektoren

pET-16b	Novagene, Madison, USA
pET-28a	Novagene, Madison, USA
pGEX-6P1+1(modifiziert)	zwischen der *Bam*HI- und der *Eco*RI-Schnittstelle befindet sich eine zusätzliche *Nde*I-Schnittstelle

3.1.6 Primer

T7-Promotor-Primer		Novagene, Madison, USA
T7-Terminator-Primer		Novagene, Madison, USA
pGEXforward:	5´-GCT GGC AAG CCA CGT TTG GT-3´	MWG-Biotech, Ebersberg
pGEXreverse:	5´-CGT CTC CGG GAG CTG CAT GT-3´	MWG-Biotech, Ebersberg

3.1.7 Käufliche Reaktionssets (Kits)

NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Sequence Mix Big Dye Terminator v1.1 sequencing kit	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.8 Chromatographiesäulen und Säulenmaterialien

Column PD-10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Einweg-Leersäulen	BioRad, München

Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 1 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HisTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Resource Q, 6 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenyl Sepharose High Performance	Amersham Pharmacia Biotech,
HiLoad 16/10	Freiburg
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech,
Superdex 200 HiLoad 16/60	Freiburg
Superdex 200 HiLoad 26/60	
Superdex 75 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech,
Superdex 75 HiLoad 26/60	Freiburg

3.1.9 Antibiotika

Ampicillin	Roche, Mannheim
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe

Die Antibiotika Stammlösungen wurden nach Sambrock et al. (1989) angesetzt, sterilfiltriert und bei –20 °C aufbewahrt. Aus diesen sterilen Stammlösungen wurden die Antibiotika den Nährmedien nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugegeben.

- Ampicillin wurde in $H_2O_{dest.}$ gelöst (100 mg/ml). Es wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt.
- Kanamycin wurde in $H_2O_{dest.}$ gelöst (50 mg/ml). Die eingesetzte Endkonzentration betrug 50 µg/ml.
- Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst (35 mg/ml). Die Endkonzentration betrug 35 µg/ml.

3.1.10 Kristallisationsscreens

Ammoniumsulphat-Screen	S. Brauns, Göttingen
Additive Screens 1-3	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Crystal Screens 1+2	Eigener Screen nach Rezeptur der Fa. Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Crystal Screen Lite	Eigener Screen nach Rezeptur der Fa. Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Crystal Screen Cryo	Eigener Screen nach Rezeptur der Fa. Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Crystal Screen PEG/Ion	Eigener Screen nach Rezeptur der Fa. Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Crystal Screen Natrix	Eigener Screen nach Rezeptur der Fa. Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Detergent Screens 1-3	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Footprint Screens 1-3	M. Rudolph, Göttingen
JB Screens 1-10	Eigener Screen nach Rezeptur der Fa. Jena Bioscience, Jena
Magic Screen	S. Andrade, Göttingen
Structure Screens 1-3	M. Rudolph, Göttingen
Strategy Screens 1-3	R. Ficner, Göttingen

3.1.11 sonstige Materialien

Cryschem-Plate (24Wells, sitting drop)	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Crystal Clear Tape	Henkel, Aachen

Einmal-Mikrotiterplatten	Schütt, Göttingen
Glasgeräte	Merck, Darmstadt
JA30-Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Pipetten (verstellbar)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefässe (0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefässe (15 ml, 50 ml)	Falcon, Deutschland
Sterilfilter 0,2µm / 0,4µm	Vivascience, Hannover
Vivaspin Konzentratoren	Vivascience, Hannover
Zentrifugenbecher (1 l, 500 ml)	Beckman Coulter, Krefeld

3.1.12 Geräte

AbiPrism 3100 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose-Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Äkta Prime, Äkta Purifier	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Autoklav HST 4-5-8	Zirbus, Bad Grund
Binokulare	Carl Zeiss, Jena
Brutschrank Mytron	Schütt, Göttingen
GelDoc Geldokumentationsgerät	BioRad, München
Gelelektrophorese- & Blotkammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Gelschüttler Promax 1020	Heidolph, Schwabach
Geltrockner Gel Air Dryer	BioRad, München
Heizbad	IKA, Staufen
Heizblock Dri-Block CB-2A	Techne, Minneapolis, USA
Innova 4230 Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA, Staufen
Microfluidizer 110 S	Microfluidics, USA
Microtip 102 C	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA

PCR-Geräte	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand, Wertheim
Röntgendiffraktometer RU-H3R	Rigaku, The Woodlands, USA
Rotationsschüttler	Karl Hecht, Staufen
Rotor JA-20 / JA-30.50 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor JLA 8.1000	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor S4180	Beckman Coulter, Krefeld
Semi-Dry Blotkammer	BioRad, München
Sonifier 250	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superloops (10 ml, 50 ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taumelrollenmischer RM5	Schütt, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Microcentrifuge II	Sylvania, Ohio, USA
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510	Bandelin, Berlin
Unitron Schüttelinkubatoren	Infors, Einsbach
Vortex	Schütt, Göttingen
Zentrifuge Allegra 21R	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-20 XPI / J-30 I / JA-20	Beckman Coulter, Krefeld

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Methoden

3.2.1.1 Mengenbestimmung von Proteinen

Die quantitative Bestimmung von Proteinlösungen erfolgt nach der Methode von Bradford (1976). In phosphosaurer Lösung lassen sich Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau anfärben. Die Proteinkonzentration kann mittels Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt werden, da sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes in einem Bereich von OD_{595} 0,1–0,9 proportional zur Proteinkonzentration ändert.

20 µl Proteinprobe werden mit 1 ml 1:5 in Wasser verdünnter Bradfordreagenz (1 mg/ml Coomassie Brilliant Blau G250 in 85 %iger H_3PO_4) versetzt und nach 10 Minuten wird die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Aus dem Vergleich zu einer durch verschiedene Konzentrationen an BSA erstellten Standardkurve, lässt sich die Proteinmenge der unbekannten Probe ermitteln.

3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen wird quantitativ im Photometer bei 260 nm gegen einen Referenzwert bestimmt (Sambrook *et al*., 1989). Folgende Umrechnungswerte werden hierbei herangezogen:

1 A (260) = 50 µg/ml doppelsträngige DNA
1 A (260) = 37 µg/ml einzelsträngige DNA

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wird über den Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt.

Während die aromatischen Basen der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum von 260 nm und ein Halbmaximum bei 280 nm besitzen, absorbiert Tryptophan, eine aromatische Aminosäure der Proteine, vor allem im Bereich von 280 nm. Reine DNA liegt bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 vor. Mit Protein verunreinigte DNA Lösungen besitzen einen kleinerem A260/A280 Quotienten.

3.2.1.3 Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation

Eine einfache Methode zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen ist die Verwendung von sogenannten Centricons und Microcons. Auf einen Zentrifugenbecher ist eine Hülse gesteckt, in deren unterem Drittel eine Membran mit bestimmter Porengrösse sitzt. Diese Membran ist durchlässig für Wasser, Ionen und kleine Moleküle, allerdings nicht für Proteine, die größer als der Ausschluss der Membran sind. Durch Zentrifugation (3.000-4.500 g, 4 °C, Zeit unterschiedlich) können Proteine auf diese Weise ankonzentriert werden.
In dieser Arbeit wurden Vivaspin Konzentratoren der Firma Vivascience verwendet.

3.2.1.4 Gelelektrophoresen

3.2.1.4.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli *et al*. (1970) wird zur analytischen und präparativen Auftrennung von Proteinen verwendet. SDS ist ein Detergens, welches aus einer aliphatischen Kette von 12 Kohlenstoffatomen besteht und eine hydrophile Sulfatgruppe besitzt. SDS lagert sich gleichmäßig an Aminosäuren an und entfaltet (denaturiert) dabei das Protein. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch β-Mercaptoethanol, das im Probenpuffer enthalten ist, reduziert und dadurch gespalten. Es entsteht ein SDS-Protein-Komplex mit nach außen gerichteten negativen Ladungen. Die Eigenladungen des Proteins sind jetzt zu vernachlässigen und der entstandene Komplex besitzt ein konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis. Unter diesen Bedingungen sind Proteine unabhängig von ihrer Faltung in einem Molekularsieb wie dem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht separierbar.

Das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese beruht auf der Fokussierung von Proteinen (Ornstein, 1964) durch einen pH-Sprung von zwei übereinander geschichteten Polyacrylamidgelen. Das untere Trenngel enthält einen Puffer mit einem pH-Wert von 8,8 und einem Leition mit hoher Ionenbeweglichkeit. Der pH-Wert des darüber geschichteten Sammelgels liegt deutlich tiefer bei 6,8. Das Leition des Sammelgels besitzt eine geringere Ionenbeweglichkeit. Der Elektrodenpuffer enthält ein Folgeion mit geringer Ionenbeweglichkeit, dessen Ladung allerdings pH-abhängig ist.

Durch das Einschalten des Stromes wandern die Leitionen des Laufpuffers mit hoher Geschwindigkeit durch das elektrische Feld und überholen dabei die aufgetragenen Proteine. Daraus resultiert hinter den Proteinen eine Zone geringerer Ionendichte und erhöhter Feldstärke, aufgrund dessen die Proteine und Folgeionen beschleunigt werden. Die Geschwindigkeit der Proteine ist dabei größer als die der Folgeionen, aber langsamer als die der Leitionen. Es resultiert die Fokussierung der Proteine als scharfe Bande an dem Feldstärkesprung. Beim Auftreffen auf das Trenngel ändern die Folgeionen aufgrund des erhöhten pH-Wertes ihre Ladung und damit ihre Ionenbeweglichkeit. Sie überholen die Proteine, die dann wieder in einem Gebiet konstanter Feldstärke wandern. Die Folge ist eine normale Gelelektrophorese. Das Trenngel wirkt als Molekularsieb, da die Proteine durch die weit engeren Poren des Trenngels in Abhängigkeit ihrer Masse verlangsamt werden und so nach ihrem Gewicht bzw. ihrer Größe aufgetrennt werden.

Für die Vorbereitung einer SDS-PAGE wurden zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt und staubfrei trocken gerieben. Zwei 1 mm dicke Abstandshalter (Spacer) wurden an den Rändern platziert und die Glasplatten wurden unten mit einem Gummi abgedichtet. Die Glaplatten wurden an den Rändern geklammert. Anschließend wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten bis 2 cm unter den Rand gegossen und für die Dauer der Polymerisation (ca. 30 min) mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird der Isopropanol abgegossen und mit Wasser nachgespült. Das Sammelgel wurde in den verbliebenen Raum zwischen den Glasplatten gegossen und der Probenkamm wurde zwischen die Glasplatten gesteckt.

Die Gummidichtung wurde nach Beendigung des Polymerisationsvorganges entfernt. Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt und das Reservoir mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig heraus gezogen und die Probentaschen mit Puffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Die Proteinproben wurden 1:1 (v/v) mit Laemmli-Puffer versetzt, falls nötig bei 95 °C für drei bis fünf Minuten aufgekocht und mittels einer Pipette in die Taschen des Gels geladen.

Für die Analyse von Zellsuspensionsproben mittels SDS-PAGE wurden 1,0 ml Kultur abzentrifugiert, mit Laemmli-Puffer (OD_{600} x 0,1 ml) versetzt. Für den Größenvergleich wurde ein Proteingrößenstandard (Marker) mit aufgetragen. Nach dem Auftragen auf das Gel ließ man die Proben bei geringer Stromstärke (ca. 15 mA) und maximaler Spannung in das Sammelgel einsinken. Nach 10-15 min wurde die Stromstärke auf 25-

30 mA erhöht, um die Proteine zu einer schmalen Bande zu fokussieren und dann zu trennen.

1 x SDS-Laufpuffer:	**2 x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer):**
192 mM Glycin	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
25 mM Tris/HCl, pH 8,3	70 mM SDS
0,1 % (w/v) SDS	50 % (v/v) Glycerin
	0,1 % (v/v) Bromphenolblau (1 % (v/v) in EtOH abs.)
	5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Ansatz für ein Sammelgel, Volumen ≈ 2 ml

30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	0,33 ml
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,40 ml
0,5 % SDS-Lösung	0,40 ml
ddH_2O	0,87 ml
TEMED	5 µl
10 % APS-Lösung	10 µl

Ansatz für ein Trenngel, Volumen ≈ 6 ml

Dichte des Trenngels	10 %	12,5 %
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	2,0 ml	2,5 ml
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	1,2 ml	1,2 ml
0,5 % SDS-Lösung	1,2 ml	1,2 ml
ddH_2O	1,6 ml	1,1 ml
TEMED	5 µl	5 µl
10 % APS-Lösung	30 µl	30 µl

3.2.1.4.2 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse und präparativen Reinigung von DNA wird die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden die Agarosegele mit 0,8 bis 1,0 % Agaroseanteil in 1x TBE-Puffer hergestellt. Agarose wurde abgewogen, mit TBE-Puffer versetzt und zum Lösen in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Für

das Gel wurde eine Flachbettkammer abgedichtet und die heiße Agaroselösung hinein gegossen. Luftblasen wurden entfernt und ein Probenkamm in das Gel gesteckt. Das Gel wurde dann gekühlt (bei 4 °C) bis es erstarrte und wurde darauffolgend in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Zum Laden der DNA Proben wurden diese mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 12 mA/cm^2 Gelfläche.

1 x TBE-Puffer:	**10 x Agarosegel-Probenpuffer:**
89 mM Tris	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
89 mM Borsäure	0,5 % (w/v) Xylencyanol FF
2 mM EDTA pH 8,0	60 % (v/v) Glycerin

3.2.1.5 Detektion von Proteinen und Nukleinsäuren

3.2.1.5.1 Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können mit Coomassie Brilliant Blue G250 sichtbar gemacht werden, wobei die Nachweisgrenze bei 0,3 µg Protein je Bande liegt. Das Gel wird nach der Elektrophorese im Coomassie-Färbebad mindestens 30 min inkubiert, intensivere Banden können mit mehrmaliger Färbung und Entfärbung oder einer Färbung über Nacht (12 - 16 h) erzielt werden. Anschließend wird das Gel unter mehrfachem Erneuern des Entfärbebads mehrere Stunden entfärbt. Gestoppt wird der Entfärbevorgang mit 5 % Essigsäure oder Wasser.

Färbelösung:	**Entfärbelösung:**
0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250	45 % (v/v) Ethanol
0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250	10 % (v/v) Essigsäure
42,5 % (v/v) Ethanol	
5 % (v/v) Methanol	
10 % (v/v) Essigsäure	

Alternativ kann das SDS-Gel in einer Lösung von 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure und 0,002 % Coomassie Brilliant Blue G 250 über Nacht gefärbt werden.

3.2.1.5.2 Anfärben von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid

Elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäuren können mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde das Gel 15-30 min im Ethidiumbromidbad, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, inkubiert und anschließend unter UV-Licht bei 254 beziehungsweise 365 nm detektiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert dabei intensiv orange. Bei 365 nm wird vor allem DNA detektiert, die noch für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen soll, also z.B. durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente. Durch längere Wellenlängen wird die Mutatiosrate herabgesetzt.

3.2.1.5.3 Proteindetektion durch Western-Blot

Mit dem Western-Blot (Towbin *et al*., 1979) kann man geringe Konzentrationen eines bestimmten Proteins in einer gemischten Proteinlösung nachweisen. Nach Auftrennung einer Proteinprobe durch eine SDS-PAGE werden die Proteinbanden durch Elektrotransfer auf eine Membran übertragen. Ein Primärantikörper gegen ein spezielles Protein kann nun an das zugängliche Zielprotein binden. Durch einen Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper mit radioaktiver Markierung oder Phosphataseaktivität kann die Proteinbande visualisiert werden. Diese Methode ist bei Verwendung von monoklonalen Primärantikörpern höchst empfindlich und spezifisch.

In dieser Arbeit wurde der semi-dry Western-Blot mit einer BioRad-Blotkammer und Sekundärantikörpern mit gekoppelter Peroxidase verwendet, um einen His-Tag spezifisch nachzuweisen.

Blot Puffer für Semi-Dry-Blot:
48 mM Tris
39 mM Glycin
0,0375 % SDS
20 % Methanol

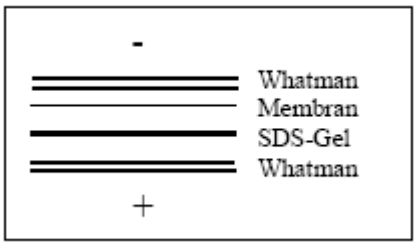


Abb. 3.4: Aufbau eines semi-dry Western-Blots

Ein frisches SDS-Gel wurde 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Zeitgleich wurden die zugeschnittene PVDF-Membran und das Whatman-Papier (2 x 2 Stücke) ebenfalls 10 min in Blotpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor für 15 min in Methanol äquilibriert.

Danach wurden Anode und Kathode der Blotkammer mit Blotpuffer angefeuchtet und gemäß Abbildung 12 wurden SDS-Gel, PVDF-Membran und Whatman-Papier blasenfrei geschichtet. Anschließend wurden 120 min mit 25 V und 150 mA geblottet. Nach dem Blot wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt, die Protein- und Markerbanden wurden mit Bleistift markiert und die Membran mit dH_2O gewaschen. Das geblottete Gel wurde mit Coomassie gefärbt, um den Proteintransfer zu dokumentieren.

TBS - Puffer:

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl

TBS-Tween/Triton - Puffer (TBSTT):

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
500 mM	NaCl
0,05 %	Tween 20
0,2 %	Triton X-100

Die Membran wurde anschließend 3 x 5 min mit TBS gewaschen und danach 1 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4 °C in 1 % BSA in TBS geblockt. Nach dem Blocken wurde die Membran 3 x 5 min mit TBSTT gewaschen. Der Primärantikörper (anti-6His-mouse, verdünnt: 1:1.000) wurde 2 h bei RT (oder über Nacht bei 4 °C) inkubiert. Anschließend wurde wieder 3 x 5 min mit TBSTT gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper (Peroxidase markierter anti-mouse, verdünnt: 1:50.000) 1,5 h bei RT (oder über Nacht bei 4 °C) inkubiert. Ein weiterer Waschschritt mit 3 x 5 min TBSTT folgte.

MSB-Färbelösung:

6 ml	4-Chlor-1-Naphtol
14 ml	100 mM Tris ph 7,5
20 µl	DPD (dimethyl-p-phenylendiamin-hydrochlorid)
8 µl	30 % H_2O_2

Die Farbreaktion wurde durch die mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert. Die Membran wurde 2-5 min in die Färbelösung gegeben bis es zur Farbreaktion kam. Als letzter Schritt wurde die Membran mit dH_2O gewaschen und getrocknet. Sie wurde dann dunkel gelagert, um ein Ausbleichen zu verhindern. In dieser Arbeit wurde versucht mittels Western-Blot His-markierte Kontaminanten in aufgereinigten hSGT-Lösungen zu detektieren.

3.2.1.5.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Diese Methode eignet sich, um 70 bp bis 10 kb lange DNA-Fragmente aus niedrig-schmelzenden Standard-Agarosegelen zu extrahieren und zu reinigen. In dieser Arbeit wurde dazu das Gel Extraction Kit der Firma Qiagen benutzt. Die durch Ethidiumbromid angefärbte DNA (vgl. 3.2.1.5.2) wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus der Agarose herausgelöst. Anschließend wurde sie an eine Säule gebunden, gewaschen und von der Säule eluiert. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektorsysteme ist diese Methode nützlich, da elektrophoretisch aufgetrennte DNA aus den Agarosegelen ausgeschnitten und so aufgereinigt werden kann. Bei den ausgeschnittenen DNA-Banden handelte es sich um bereits mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente und Vektoren, die von ungeschnittener und einfach geschnittener DNA getrennt wurden.

3.2.1.5.5 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele können zu Dokumentationszwecken zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet werden. Dazu wurde zunächst eine in Wasser eingeweichte Cellophanfolie, dann das Polyacrylamidgel und anschließend eine zweite in Wasser eingeweichte Cellophanfolie auf einen Spannrahmen gelegt. Das Gel musste gut entsalzt sein, da

sonst Verfärbungen auftraten. Zwischen Gel und den Folien, sowie zwischen beiden Folien, sollte sich keine Luftblase befinden, um ein Einreißen des Gels zu vermeiden. Nun wurde ein zweiter Rahmen auf die Folien gelegt und mit Klammern fixiert. Im Geltrockner bei etwa 70 °C in heißer Umluft war das Gel nach zwei Stunden getrocknet. Bei Raumtemperatur war das Gel nach 20 Stunden getrocknet und konnte aus den Rahmen genommen und archiviert werden.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Klonierung der Gensequenz von hSGT in Expressionsvektoren

Plasmide sind bei Bakterien natürlich vorkommende, ringförmige DNA-Moleküle, die zusätzliche Gene tragen (z.B. Antibiotikaresistenzen) und zwischen Bakterien ausgetauscht werden können. Es ist auch möglich, solche Plasmide zu modifizieren und in Bakterien einzuschleusen.

Bei Klonierungen wird das Zielgen zunächst amplifiziert und anschließend in einen geeigneten Vektor gebracht. Das daraus resultierende Plasmid besitzt für die nachfolgende Expression der eingebrachten Gene wichtige Eigenschaften, wie zum Beispiel einen induzierbaren Promotor für eine Regualtion der Expression, Gene für die Inaktivierung von Antibiotika und schließlich die Gensequenz für die Expression des Zielproteins. Wichtig bei Klonierungen ist, dass das Zielgen im Leseraster liegt.

Für die Proteinexpression beliebte Vektoren sind solche, die aufwärts (in 5'-Richtung) oder abwärts (in 3'-Richtung) vom einklonierten Gen eine codierende Sequenz für ein Peptid oder Protein besitzen, welches als Markierung dient. Eine solche Markierung (engl. tag) erleichtert durch die Fusion mit dem zu untersuchenden Protein die spätere Proteinaufreinigung. Solche Konstrukte sind z.B. N-terminale GST (Gluthation-S-transferase)-Fusionsproteine in pGEX-Vektoren oder N- oder C-terminale His-Sequenz-Proteine in einigen pET-Vektoren.

3.2.2.1.1 DNA-Amplifizierung durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode, um DNA-Sequenzen spezifisch zu amplifizieren (Saiki *et al*., 1985) (Mullis *et al*.,

1986). Für die PCR werden kurze, die gewünschte Sequenz flankierende 3'- und 5'-DNA-Oligonukleotide, kurz: Oligos, von etwa 20 bis 30 Basenpaaren Länge benötigt. Dies sind so genannte „primer", die den Anfangs- beziehungsweise Endpunkt der Sequenz definieren und als Startpunkt für das Enzym DNA-Polymerase dienen. Zur Durchführung der PCR werden zu einer DNA-Lösung, welche die Zielsequenz besitzt, ein Paar von Primern, alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase, z.B. aus Thermus aquaticus, gegeben.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

I. Spaltung der DNA-Doppelhelix: für die Hitzedenaturierung der DNA wird das Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt. Die beiden komplementären DNA-Stränge werden voneinander getrennt.

II. Hybridisierung der Primer mit der DNA („annealing"): der PCR-Ansatz wird auf eine Temperatur gesenkt, die etwa 3 °C unter den Schmelzpunkten der Primer liegt, um ein optimales, weil hochspezifisches Hybridisieren der Primer mit der DNA zu gewährleisten.

III. DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase: die optimale Temperatur für die verwendeten Taq- und Pfu-DNA-Polymerasen liegt bei 68-72 °C. Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab und sollte bei etwa 1 min pro 1000 Basenpaaren liegen.

Diese drei Schritte laufen mehrmals hintereinander ab, um eine ausreichende Menge an PCR-Produkt zu erhalten. Die bereits entstandenen DNA-Stränge dienen in den Folgezyklen wiederum als Matrizen, so dass die Vermehrung der zu amplifizierenden DNA-Sequenz exponentiell zunimmt.

Für einen typischen PCR-Ansatz (50 µl) wurde pipettiert:

1 µl	5'-Primer 10 mM
1 µl	3'-Primer 10 mM
1 µl	dNTPs 100 mM
5 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10x)
1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
40 µl	ddH_2O
1 µl	DNA (200 ng/µl)

Die PCR zur Amplifizierung von hSGT aus pET16b in *E. coli* BL21(DE3) wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung	94 °C	10 min	
2. Denaturierung	94 °C	30 s	
3. Hybridisierung	56 °C	30 s	
4. Elongation	72 °C	2 min	(Schritte 2-4 30x wiederholen)
5. Elongation	72 °C	7 min	
6. Pause	4 °C		

Für die Klonierung der Gensequenz für das zu untersuchende Protein in Vektoren enthalten die Primer normalerweise bereits die Sequenzen für die 5'- und 3'-Restriktionsschnittstellen, mit deren Hilfe das korrekte Einpassen der DNA-Sequenz in den Zielvektor gelingt. Bei der Umklonierung eines Gens von einem Vektor in den anderen können diese Restriktionsschittstellen für den Zielvektor entweder durch Primer in der PCR eingeführt werden, oder sie werden durch einen Zwischenklonierungsschritt aus einem weiteren Vektor in den Zielvektor „eingeschleppt".

Um den Einbau eines Inserts in einen Vektor nach einer erfolgreichen Transformation eines Bakterienstammes mit diesem Vektor zu untersuchen, kann eine Kolonie-PCR durchgeführt werden. Die einzelnen transformierten Kolonien auf einer Selektionsplatte können so auf das richtige Insert untersucht werden. Alternativ kann auch eine Test-Restriktion durchgeführt werden. Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wird in einem Agarosegel aufgetrennt und das so erhaltene Bandenmuster wird dann mit dem erwarteten Bandenmuster verglichen.

3.2.2.1.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in DNA-Doppelhelices und hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Nukleotiden (Smith *et al*., 1973). Man findet diese Enzyme in Prokaryoten, dort dienen sie dem Abbau von Fremd-DNA. In der eigenen DNA sind die entsprechenden Erkennungssequenzen modifiziert (methyliert) und werden daher nicht geschnitten. Restriktionsendonukleasen haben für das Klonieren von DNA große Bedeutung gewonnen. Ihre bemerkenswerteste Eigenschaft besteht darin, Sequenzen mit

zweifacher Rotationssymmetrie, so genannte Palindrome, zu erkennen und so zu spalten, dass überhängende DNA-Enden, „sticky ends“ entstehen. Diese überhängenden DNA-Enden hybridisieren leicht mit komplementären Enden und ermöglichen so das gerichtete Einklonieren in mit den gleichen Enzymen ebenfalls zu „sticky ends“ geschnittene Vektoren.

Ein typischer Ansatz von 20 µl enthielt:

1 µg	DNA
2 µl	Restriktionsenzympuffer (10x)
0,5 µl (entspricht 1 U)	Restriktionsendonuklease für 3’-Schnittstelle
0,5 µl (entspricht 1 U)	Restriktionsendonuklease für 5’-Schnittstelle
2 µl	BSA (10x) (von einigen Enzymen benötigt)
ad 20 µl	ddH_2O

Der Ansatz wurde für 1-12 h (abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die geschnittenen Fragmente in einem Agarosegel analysiert und gegebenenfalls für anschließende Klonierungen aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

3.2.2.1.3 Ligation eines verdauten DNA-Fragments in einen Zielvektor durch DNA-Ligasen

Ligasen katalysieren die Phosphodiesterbildung benachbarter Nukleotide eines DNA-Stranges. In der Natur spielen sie deshalb bei der DNA-Replikation eine entscheidende Rolle. Sie verknüpfen z.B. bei der DNA-Replikation die Okazaki-Fragmente eines zum Mutterstrang neu gebildeten, komplementären Tochterstranges. In der Molekularbiologie werden sie dazu benutzt, komplementäre sticky ends von DNA-Fragmenten nach der Hybridisierung der überhängenden Enden zu verknüpfen. Sie ermöglichen auf diese Weise das Einklonieren von Genen in ein geschnittenes Plasmid.

Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,2 µl	T_4-DNA-Ligase (10 U/µl)
2 µl	geschnittener Vektor
6 µl	Insert (verdautes Gen)
2 µl	T_4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
ad 20 µl	ddH_2O

Die Ligation wurde bei 4 °C über Nacht oder bei 16 °C über 3-6 Stunden durchgeführt.

3.2.2.2 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA wird mit der didesoxy-Methode nach Sanger (1977) durchgeführt. Dabei werden bei der Amplifizierung der zu sequenzierenden DNA in einer PCR Kettenabbrüche der Polymerase-Reaktion durch den zufälligen Einbau eines ddNTPs (didesoxy-Ribonukleosidtriphosphat) erzeugt. Hierzu werden vier PCR-Ansätze mit dNTPs versetzt. Eines der vier liegt jedoch nicht als dNTP, sondern als ddNTP vor. Da hier die 3'-OH-Gruppe fehlt, kommt es zum Kettenabbruch. Der Statistik folgend ist damit jedes mögliche auf das entsprechende ddNTP-endende Fragment im jeweiligen Reaktionsansatz vorhanden. Durch einen Längenabgleich der Fragmente aus den vier Reaktionsansätzen kann so die Sequenz abgeleitet werden. Mit dem Seq-Mix BigDye Terminator v1.1 von Applied Biosystems kann die komplette Reaktion in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden.

Für eine typische Sequenzierungs-PCR wurde folgender Ansatz pipettiert:

200 ng	DNA (Template)
8 pmol	Primer
1 µl	Seq-Mix
1 µl	Seq-Puffer
ad 10 µl	ddH_2O

Als PCR-Programm für Sequenzierungsreaktionen wurde folgendes Programm verwendet:

1. Denaturierung	96 °C	2 min	
2. Denaturierung	96 °C	30 s	
3. Hybridisierung	50 °C	20 s	
4. Elongation	60 °C	4 min	Schritte 2-4 30x wiederholen
5. Elongation	60 °C	4 min	
6. Pause	12 °C		

Nach der PCR wurden die Produkte für den Sequenzierungsautomaten aufgereinigt, um störende Faktoren wie Primer und Polymerase zu entfernen.

Dem PCR-Ansatz wurden 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M NaAc und 50 µl Ethanol zugegeben. Dann wurde vorsichtig durch leichtes Antippen mit der Fingerspitze durchmischt, für 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (20.000 x g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 70 µl Ethanol 70 %

gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (20.000 x g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl HPLC-Wasser aufgenommen. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in dieser Arbeit in einem Kapillarsequenzierer von Applied Biosystems analysiert.

3.2.2.3 Plasmidpräparationen

Die Methoden zur Plasmidpräparation basieren auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim *et al*., 1979).

3.2.2.3.1 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab

Bei Mini-Präparationen (kurz: „Mini-Preps“) werden Plasmide aus einer 10-50 ml großen *E. coli*-Übernachtkultur isoliert. Für Mini-Preps wurde das NucleoSpin Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet. Dabei wurde nach den Angaben zur Isolation im Benutzerhandbuch des Herstellers verfahren.

3.2.2.3.2 Plasmidpräparation im mittleren Maßstab

Für die Vermehrung und Isolierung von DNA in mittlerem Maßstab, um klonierte Plasmide für Expressionsetablierungen zu erhalten, wurden Midi-Präparationen (kurz: „Midi-Preps“) durchgeführt. Dabei wurden 100-200 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur aufgeschlossen und die DNA präpariert. In dieser Arbeit wurde das Plasmid Midi Kit von Qiagen benutzt und die DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Medien zur Aufzucht von *E. coli*

LB-Medium:	10 g	Bacto-Tryptone
	5 g	Bacto-Yeast extract
	10 g	NaCl
	ad 1 l H_2O.	

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren, die Lagerung bei 20 °C (Bertani, 1951).

LB-Agar für Selektionsplatten:	250 ml	LB-Medium
	3 g	Agar-Agar

Der Agar wurde durch Erhitzen gelöst. Sobald der LB-Agar unter stetigem Rühren auf etwa 40-45 °C abgekühlt war, wurden 250 µl Ampicillin (100 mg/ml) und/oder Chloramphenicol (100 mg/ml) und/oder Kanamycin (50 mg/ml) unter Rühren zugegeben. Nun wurde der Agar in Platten gegossen. Sollten die Agar-Platten nicht selektiv sein, so wurde auf den Zusatz von Antibiotika verzichtet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.2.3.2 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Alle Bakterienstämme wurden in LB-Medien oder auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Suspensionskulturen wurden in Reagenzgläser bzw. in Glaskolben, die bis maximal 25 % des Gesamtvolumens befüllt waren, bei 200 rpm geschüttelt.
Die Aufbewahrung von Bakterienstämmen erfolgte als Glycerolstock, wobei eine LB-Übernachtkultur auf eine Endkonzentration von 20 % mit Glcerol versetzt und bei –80 °C gelagert wurde. Bakterienstämme, die für einen kürzeren Zeitraum (bis zu vier Wochen) aufbewahrt werden sollten, wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.3.3 Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm in einem Eppendorf-Photometer bestimmt. Als Referenz diente hierbei das Medium, in dem die Bakterien herangezogen wurden.

3.2.3.4 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

E. coli Zellen enthalten nach der Transformation einen Vektor, der ein einkloniertes Fremdgen enthält. Gleichzeitig können ein oder mehrere Gene für Antibiotikaresistenzen enthalten sein. Die Antibiotikaresistenzen auf dem eingebrachten Plasmid ermöglichen das Wachstum der plasmidtragenden Bakterien auf einem antibiotikahaltigem Medium, das gleichzeitig wachstumshemmend oder letal auf andere Bakterien, die das Plasmid nicht enthalten, wirkt. So können plasmidtragende Bakterien durch Antibiotika positiv selektiert und Kontaminationen mit fremden Bakterien vermieden werden. Das einklonierte Fremdgen ist bei den hier verwendeten Plasmiden

so lokalisiert, dass die Expression unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Lac-Promotors, z.B. T5 oder T7, oder eines AHTC-induzierbaren TetA-Promotors liegt und gleichzeitig das Gen im offenen Leserahmen zu liegen kommt. Das eingebrachte Plasmid erlaubt unter diesen Bedingungen die selektive Expression des klonierten Fremdgens.

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme benötigten zusätzlich zu den Selektionsantibiotika, die für die Expression benötigt wurden,z.B. Kanamycin für den Erhalt des pREP4-Plasmides, das für einen Promotorrepressor codiert. Dieser senkt die Basisexpression und verhindern so die Vermehrung von im Wachstum begünstigten Deletionsmutanten. Einige benötigen z.B. Chloramphenicol für den Erhalt der RIL-Plasmide. RIL-Plasmide enthalten extra Kopien der Gene, für in *E. coli* nicht so häufig vorkommende tRNAs; dies sind unter anderem die für Arginin (argU), Isoleucin (ileY) und Leucin (leuW).

3.2.3.4.1 Untersuchung der Condon Usage

Die Codon Usage beschreibt das Phänomen, dass innerhalb des degenerierten Codes bestimmte Codons von einzelnen Spezies bevorzugt genutzt werden. Diese Nutzung entspricht dann auch der tRNA-Konzentration innerhalb der Zelle. Die Codon Usage spielt auch eine große Rolle bei der Regulation der Proteinbiosynthese. Während häufig benutzte Codons die Translation beschleunigen können, kann sie von selten benutzten Codons auch gebremst werden. Bei der Expression humaner Proteine in Bakterien kann es somit zu einer verminderten Effizienz derselben kommen.

Die Analyse der Codon Usage wurde mit der Software: GCUA (graphical codon usage analyser) erstellt. Dieses Programm wurde von Herrn Thomas Schödl entwickelt.

3.2.3.5 Transformationen in Bakterienstämme

3.2.3.5.1 Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Für die Transformation von *E. coli* mit einem gewünschten Vektor muss der entsprechende Bakterienstamm zuerst kompetent für die Aufnahme von Plasmiden gemacht werden. Dies geschieht nach der $CaCl_2$-Methoden (Cohen *et al*., 1972) Dabei wird die Zellmembran des Bakteriums durch eine chemische Behandlung mit $CaCl_2$

perforiert. Durch diese poröse Membran können nun Plasmide in das Bakterium eingeschleust werden.

Zunächst wurde ein Aliquot des Stammes, der kompetent gemacht werden soll, auf einer antibiotikafreien LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die 5 ml Vorkultur wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation (6.000 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 150 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3.000 g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden nun unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

TFB1-Puffer:

30 mM	KAc pH 7,0
50 mM	$MnCl_2$
10 mM	$CaCl_2$
100 mM	$RbCl_2$
15 % (v/v)	Glycerin

Der pH wurde mit 0,2 M HAc auf 5,8 eingestellt.
Es folgte Sterilfiltration

TFB2-Puffer:

10 mM	NaMOPS pH 7,2
75 mM	$CaCl_2$
10 mM	$RbCl_2$
15 % (v/v)	Glycerin

Der pH wurde mit 1 M NaOH auf 6,5 eingestellt.
Es folgte Sterilfiltration.

3.2.3.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Zu 50 µl kompetenter Zellen wurden 20 µl Ligationsansatz oder 100 ng bis 1 µg Plasmid-DNA pipettiert und gemischt. Die Zellen wurden dann 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für die DNA-Aufnahme wurden die Zellen bei 42°C für 60 Sekunden inkubiert und anschließend 3 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium wurden die Zellen 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 50 µl, 100 µl und 200µl des Transformationsansatzes wurden je auf einer Selektionsplatte ausgestrichen, kurz an der Luft getrocknet und die Platten umgedreht über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Transformationen von Ligationsansätzen wurde die

angewachsene 1 ml-Kultur scharf abzentrifugiert, das LB-Medium wurde vollständig abgenommen und durch 100 ml frisches LB-Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann durch Pipettieren resuspendiert und der gesamte Ansatz wurde ausplattiert. Auf diese Weise konnte man schon einen großen Teil der DNA (Vektor und Insert) abtrennen, die nicht aufgenommen wurde.

3.2.3.6 Überexpression von rekombinanten Proteinen in E. coli

3.2.3.6.1 Anzucht einer Vorkultur

Für eine Bakterienkultur, die zur Überexpression von rekombinanten Proteinen herangezogen werden soll, wird zunächst eine Vorkultur angezogen. In einem Kolben wurden 10-50 ml LB-Medium mit den Selektionsantibiotika versetzt und mit einem Abstrich einer bewachsenen Agarplatte angeimpft. Bei 37 °C wurde die Kultur schüttelnd für 14 bis 16 Stunden inkubiert.

3.2.3.6.2 Anzucht einer Expressionskultur

Im Allgemeinen wurde LB-Medium im gewünschten Endvolumen, z.B. 1 Liter, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit der vorbereiteten *E. coli* Vorkultur 1:30 bis 1:100 angeimpft. Im Inkubator wurden die Zellen bei 37 °C, dem Temperaturoptimum von *E. coli*, oder bei geringeren Temperaturen bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5-0,7 wachsen gelassen.

Wurden größere Mengen an Protein benötigt, konnte eine Anzucht der Expressionskultur in einem 10 l Bioreaktor durchgeführt werden. In Abhängigkeit der Zelldichte ändert sich die Sauerstoffaufnahme und die CO_2-Produktion einer Zellkultur. In einem ungeregelten System kann die Gelöstsauerstoffkonzentration und der pH-Wert nicht konstant gehalten werden, dadurch variieren diese beiden Größen und beeinflussen den Kultivierungsverlauf. Aus diesem Grund erfolgte ein ScaleUp der Expressionsbedingungen auf einen 10 Liter Bioreaktor mit pO_2- und pH-Sonde. Erst in Bioreaktoren mit pO_2- und pH-Sonde und einer Regelung beider Parameter durch automatische Variation der Zusammensetzung der Gaszufuhr und bedarfsgerechter Zugabe von Natronlauge, können pO_2- und pH-Wert konstant gehalten werden.

Die Proteinexpression für das His-hSGT-Fusionsprotein wurde in einem System mit 10 Liter Reaktorvolumen durchgeführt. Der verwendete Reaktor wurde zur Sterilisation mit allen installierten Komponenten, wie z.B. Schläuchen und Flaschen in einen Großraumautoklaven (HST 4-5-8, Bad Grund) bei 121 °C für eine Stunde dampfsterilisiert. Die Kultivierung erfolgte im Batch-Verfahren. Die Bedingungen wurden auf 20 °C und einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die Durchmischung erfolgte mit 500 Upm. Nach der Zellernte wurde das Zellpellet aus dem Fermenter in 10 mal 50 ml Reaktionsgefäße der Fa. Eppendorf, Deutschland aliquotiert und bei –20 °C zur späteren Nutzung tiefgefroren. Bei Ernte und Aufschluss der Zellen wurde wie in Abschnitt 3.2.3.7 beschrieben verfahren.

Zur Induktion der Proteinexpression wurde die Zellsuspension mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 bis 1 mM versetzt. Nun wurden die Zellen weiter schüttelnd inkubiert, bis eine OD_{600} von 1,5-2,0 erreicht ist. An diesem Punkt verlässt die Kultur den logarithmischen Wachstumsbereich und geht in die stationäre Phase über. Die Zellen wurden 15 min bei 6000 x g und 4° C abzentrifugiert und das Pellet bis zur Proteinaufreinigung bei –20 °C gelagert.

Einige Proteine akkumulieren in *E. coli* in so genannten Proteineinschlusspartikeln (engl. inclusion bodies). Es gibt mehrere Möglichkeiten, dies zu vermeiden. Zunächst kann die Induktionstemperatur gesenkt werden, um eine niedrigere Expressionsrate zu erreichen. Zusätzlich kann 1-2 % Glucose zugegeben werden, um die Basisexpression des Zielproteins zu reprimieren. Da nämlich das einklonierte Gen unter der Kontrolle eines Lac-Promotors liegt, wirkt ein Abbauprodukt der Lactose, wie z.B. Glucose, inhibierend auf die Repressorfreisetzung vom Promotor vor dem eigentlichen Gen. Glucose reprimiert ebenfalls die Synthese anderer Proteine, die an Stoffwechselwegen beteiligt sind. Schließlich können andere Expressionsstämme getestet werden.

Folgende Expressionsvektoren wurden in verschiedene Wirtsstämme transformiert:

exprimiertes Protein	*Expressionsvektor*	*Antibiotikaresistenz*
His-hSGT	pET16b	Ampicillin
His-hSGT	PET28a	Kanamycin
GST-hSGT	pGEX6pI+I	Ampicillin

3.2.3.7 Ernten und Aufschließen von *E. coli*-Zellen

Um rekombinante Proteine aus Bakterienzellen zu isolieren, müssen die Zellen geerntet und aufgebrochen werden. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation (6.000 x g, 15 min, 4 °C) und einmaligem Waschen in eiskaltem PBS-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 7,4) mit anschließender Zentrifugation (4.800 g, 20 min, 4 °C). Der Zellaufschluss konnte mechanisch, durch pneumatische Zelldesintegration (Fluidizer), durch Zusatz von Lysozym und Schockgefrieren oder physikalisch durch Ultraschalldesintegration (Sonifier) erfolgen. In dieser Arbeit wurden die Bakterienzellen mit Lysozym, im Fluidizer mit vorhergehender Ultraschallbehandlung im Sonifier aufgeschlossen.

Ein Zellpellet aus 1 l Schüttelkultur wurde in 25 ml Lysispuffer mit Lysozym aufgetaut und resuspendiert. Um proteolytische Enzyme zu inaktivieren, wurde vor dem Auftauen eine halbe Tablette Protease Inhibitor Cocktail Complete EDTA-free im Lysispuffer gelöst. Der Zellaufschluss im Fluidizer wurde bei 80-90 psi in 5-7 Zyklen durchgeführt. Beim Aufschluss im Sonifier wurde die Zellsuspension auf Eiswasser fünfmal für 25 Sekunden sonifiziert. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: duty cycle 50 %, output control 6.

Nach dem Aufschluss der Zellen wurde die Suspension in JA30-Zentrifugenröhrchen überführt und ultrazentrifugiert (108.000 x g, 30 min, 4 °C). Alternativ konnten die Zelltrümmer auch durch 30 minütige Zentrifugation bei 40.000 x g (4 °C) und anschließender Sterilfiltration mit einen 0,2 µm Vorsatzfilter von Vivascience entfernt werden. Nach der Trennung des Lysats in Zelltrümmer und Überstand wurde Proben über SDS-PAGE analysiert und der Überstand wurde chromatographisch aufgetrennt.

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 Chromatographische Trennmethoden

Es gibt zahlreiche chromatographische Trennmethoden, wie z.B. Affinitäts-, Gel-, Ionenaustausch- oder Gaschromatographie. Bei der nativen Trennung von Proteinen wird meist auf Affinitäts-, Ionenaustausch- und Gelchromatographie zurückgegriffen.

Die Affinitätschromatographie beruht auf spezifischen und reversiblen Interaktionen

von Säulenmaterial und Molekül. Abhängig von der Beschaffenheit des Säulenmaterials und der Probe adsorbieren Moleküle an die Matrix. Das Adsorbens kann von der Säule durch kompetitive Verdrängung, Konformationswechsel durch Änderung des pH-Wertes oder durch Änderung der Ionenstärke eluiert werden. Die Affinitäts-chromatographie stellt eine sehr spezifische und selektive Trennmethode für Biomoleküle dar.

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden geladene Moleküle nach ihrer Ionenstärke bei einem bestimmten pH-Wert aufgetrennt. Die Trägermatrix der Chromatographiesäule bietet dabei Gegenionen als Bindungspartner für die aufzutrennenden Moleküle an. Die Auftrennung erfolgt über kompetitive Verdrängung der Probemoleküle durch stärkere Ionen im Elutionspuffer. Bei Kationentauschern werden Kationen wie Na^+ oder NH_4^+ verwendet, bei Anionentauschern Cl^- oder SO_4^{2-} Schwach geladene Moleküle eluieren früher als stark geladene. Auf diese Weise können Proteine nativ nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt werden.

Die Ausschlusschromatographie (Gelfiltration) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe auf. Die hierbei verwendeten Chromatographiesäulen bestehen aus einem porösen Gelmaterial mit definierter Porengröße. Das Trennverhalten basiert auf den unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina der Probenmoleküle. Je nach Molekülgröße, Molekülgestalt und gewählten Säuleneigenschaften dringen die Moleküle unterschiedlich tief in die Gelmatrix ein. Kleineren und globulären Molekülen steht mehr Raum zur Diffusion zur Verfügung als größeren und ungeordneteren. Daher erfahren kleinere Moleküle durch das tiefere Eindringen in die Gelmatrix eine Verzögerung und eluieren später von der Säule als größere. Der Elutionspuffer hat ebenfalls einen Einfluss auf die Trennung der Moleküle. Entscheidend ist hierbei das Löslichkeitsverhalten unterschiedlicher Moleküle bei der Salzkonzentration des Puffers. Die Ausschlusschromatographie ist daher eine beliebte Methode, um Proteine nach den ersten Aufreinigungsschritten von Verunreinigungen abzutrennen. Die Auflösung ist abhängig von der Flussgeschwindigkeit und dem aufgetragenen Probenvolumen, wobei kleine Volumina vorzuziehen sind.

3.2.4.1.1 Affinitätschromatographische Trennung von Proteinen mit His-Sequenz über Ni-NTA-Sepharose

Proteine, die mit N- oder C-terminaler His-Sequenz exprimiert wurden, lassen sich selektiv über eine Affinitätschromatographie mittels immobilisierter Metallchelat-komplexe aufreinigen (IMAC, engl. immobilized metal chelating affinity chromatography). Hierbei bilden zwei Histidine über die freien Elektronenpaare ihrer Stickstoffe koordinative Bindungen zu einem immobilisierten Metallion aus. Dabei bildet sich ein Chelatkomplex, der kompetitiv durch Imidazol aufgelöst werden kann. Die Metallionen (z. B. Ni oder Co) müssen zweiwertig sein und sind meistens an NTA(Nitrilotriessigsäure)-Sepharose gebunden. Bei der IMAC dürfen die verwendeten Puffer weder DTT noch EDTA enthalten, da chelatkomplexbildende Substanzen die Kopplung der Proteine stören. Anstelle von DTT wird daher β-Mercaptoethanol eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden für die Aufreinigung von Proteinen mit His-Sequenz die HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säulen von Amersham Pharmacia Biotech benutzt. Nickel ist über vier koordinative Bindungen an NTA gebunden. NTA ist kovalent an die Sepharose-Trägermatrix gebunden. Für die Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Sepharose wurden Äkta-Purifier-HPLCs benutzt.

Nach dem Laden der Proteinprobe auf die Säule über einen 50 ml-Superloop wird mit vier Säulenvolumina 20 mM Imidazol im Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wird über einen aufsteigenden Imidazolgradienten eluiert. Das Eluat wird fraktioniert und die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben, die das Zielprotein enthalten, werden gepoolt. Der Pool wird für weitere Aufreinigungsschritte bei 4° C gelagert.

Wasch-/Bindungspuffer:		**Elutionspuffer:**	
20 mM	Tris/HCl, pH 7,5	20 mM	Tris/HCl pH, 7,5
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol	600 mM	Imidazol
2 mM	β-Mercaptoethanol	2 mM	β-Mercaptoethanol

3.2.4.1.2 Affinitätschromatographische Trennung von Proteinen mit GST-Sequenz über Glutathion Sepharose (im Batch Verfahren)

Die Glutathion S-Transferase (GST) ist ein Enzym, welches als Bestandteil eines Fusionsproteins die Reinigung von rekombinanten Proteinen erleichtert. Proteine, die mit GST-Sequenz exprimiert wurden, lassen sich selektiv über eine Affinitätschromatographie mittels Glutathion Sepharose aufreinigen. Hierbei wird die Affinität von GST zu dem Tripeptid N-Glu-Cys-Gly-C (kurz GSH) benutzt, um GST-gekoppelte Proteine aus einem Prtoteinextrakt von *E. coli* zu reinigen. Der Ligand GSH ist dabei kovalent an eine Trägermatrix wie z.B. Agarose gebunden. Das Zielprotein, welches als GST-Fusionsprotein exprimiert wurde kann somit an die Matrix binden, während die restlichen *E. coli*-Proteine ohne zu binden durch die Matrix laufen. Durch einen Überschuß an GSH kann das GST-Protein wieder von der Matrix eluiert werden. Die Glutathion S-Transferase stammt aus Erythrozyten und schützt gemeinsam mit Glutathion die Zelle, Proteine und Hämoglobin vor Oxidation. Glutathion wird oxidiert, wobei ein Glutathiondimer mit einer Schwefelbrücke entsteht. Glutathion S-Transferase reduziert die entstandenen Glutathiondimere zu Glutathion, während es selbst an Glutathion bindet.

6 ml Glutathion Sepharose 4B (Amersham Bioscience, Freiburg), welche vom Hersteller als 20 %ige Ethanollösung geliefert wurde, wurde auf eine Leersäule (Poly-Prep Chromatography Columns, Biorad, München) gegeben und mit drei Säulenvolumen H_2O gewaschen. Für die Aufreinigung des GST-hSGT-Fusionsproteins wurden 25 ml des löslichen Proteinextraktes einer 1 l Expressionskultur auf eine mit GSH-Puffer-1 äquilibrierten Säule gegeben und anschließend so lange mit Puffer-1 gewaschen, bis mittels Biorad-Test keine Proteine mehr nachweisbar waren. Entweder wurde das GST-Fusionsprotein sogleich durch Zugabe von GSH-Puffer-2 von der Säule eluiert, oder das GST-hSGT-Fusionsproteine wurde zuvor noch auf dem Säulenmaterial mit PreScission Protease in hSGT und GST-Tag gespalten (siehe Abschnitt 3.2.4.4).

GSH-Puffer-1:

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
120 mM	NaCl
2 mM	DTT

GSH-Puffer-2:

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
120 mM	NaCl
2 mM	DTT
15 mM	reduziertes Glutathion

Die Regeneration der Säule erfolgte durch Waschen mit zwei Säulenvolumen H_2O, ein Volumen 6 M Guanidinium-Hydrochlorid und einem Säulenvolumen H_2O. Anschließend wurde die Säule in 20 % Ethanol überführt.

3.2.4.1.3 Anionenaustauschchromatographie über ResourceQ bzw. MonoQ zur Trennung geladener Proteine

Die ResourceQ-Säule (6 ml Fertigsäule von Amersham Pharmacia Biotech) besitzt starke kationische Eigenschaften. Ihre Gelmatrix ist mit einem quartären Amin verknüpft, das stark positiv geladen ist. DieGelmatrix für die Mono Q HR 16/10-Säule von Amersham ist ebenfalls mit quartären Aminen verknüpft. Die Mono Q-Säule von Amersham besitzt aber insgesamt eine etwas stärkere Trennleistung als die Resource Q. Die Bindung von Anionen ist stark und besonders selektiv. Schwach geladene Moleküle, das heißt solche, deren pI knapp über dem Puffer-pH (zwischen 0 und 1 pH-Einheiten darüber) liegt, eluieren früher, stärker geladene, das heißt jene, deren pI den Puffer-pH deutlich übersteigt, eluieren später. Entscheidend für eine erfolgreiche Aufreinigung ist daher die Wahl des pH-Wertes im Elutionspuffer, der etwa eine pH-Einheit über dem pI des aufzureinigenden Proteins liegen sollte.

Vor der Benutzung der Resource Q-Säule (bzw. der MonoQ-Säule) wurde mit drei Säulenvolumina ddH_2O gespült und mit drei Volumina Startpuffer äquilibriert. Dann wurde die Probe über einen Superloop geladen, die Säulenmatrix mit mindestens drei Volumina Puffer gewaschen und anschließend mit einem linear steigenden Salzgradienten eluiert. Es wurden meist 3 ml-Fraktionen gesammelt, die später via SDS-PAGE analysiert wurden. Die Fraktionen mit dem Zielprotein wurden vereinigt und für weitere Aufreinigungsschritte bei 4 °C aufbewahrt.

Wasch-/Bindepuffer:		**Elutionspuffer:**	
20 mM	Tris/HCl pH 7,0	50 mM	Tris/HCl, pH 7,0
		500 mM	NaCl
2 mM	DTT	2 mM	DTT
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA

Die Säulen wurden nach Benutzung mit 1 M NaOH gespült und wieder in 20 % Ethanol überführt.

3.2.4.1.4 Ausschlußchromatographie (Gelchromatographie, Gelfiltration, size exclusion)

Die Ausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Grösse auf. Die hierbei verwendeten Chromatographiesäulen bestehen aus einem porösen Gelmaterial mit definierter Porengröße. Das Trennverhalten basiert auf dem unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina der Probenmoleküle. Je nach Molekülgröße, Molekülgestalt und gewählten Säuleneigenschaften dringen die Moleküle unterschiedlich tief in die Gelmatrix ein. Kleineren und globulären Molekülen steht mehr Raum zur Diffusion zur Verfügung als größeren und ungeordneteren. Daher erfahren kleinere Moleküle durch das tiefere Eindringen in die Gelmatrix eine Verzögerung und eluieren später von der Säule als größere. Der Elutionspuffer selbst hat ebenfalls einen Einfluss auf die Trennung der Moleküle. Entscheidend ist hierbei das Löslichkeitsverhalten unterschiedlicher Moleküle bei der Salzkonzentration des Puffers. Die Ausschlußchromatographie ist daher eine beliebte Methode, um Proteine nach den ersten Aufreinigungsschritten von Verunreinigungen zu befreien. Die Auflösung ist abhängig von der Flußgeschwindigkeit und dem aufgetragenen Probenvolumen, wobei kleine Volumina vorzuziehen sind.

3.2.4.1.4.1 Präparative Ausschlußchromatographie

Die HiPrep 26/60 Superdex 200 Säule von Amersham Pharmacia Biotech eignet sich zur Trennung von Proteinen mit einer Molekülmasse von weniger als 600 kDa und die HiPrep 26/60 Superdex 75 Säule trennt Proteine bis 70 kDa Größe. Ihre Gelmatrix besteht aus Allyldextran, das kovalent zu N,N'-Methylenbisacrylamid verknüpft ist. Nach Äquilibrierung der Säule mit 1,5fachem Säulenvolumen Elutionspuffer wird die Probe in einen Loop injiziert und von diesem auf die Säule aufgetragen. Die Proteinprobe wird von der Säule mit Puffer eluiert, 3-5 ml große Fraktionen werden aufgefangen und die Fraktionen anschließend im SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Elutionspuffer:

20mM	Tris/HCl pH 7.5
100mM	NaCl
2mM	β-Mercaptoethanol

3.2.4.1.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität voneinander getrennt. Proteine mit ihren hydrophoben und hydrophilen Regionen werden in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration auf eine entsprechende Säule aufgetragen. Das Salz entzieht den Proteinen ihre Hydrathülle, somit treten vermehrt unpolare Gruppen an die Oberfläche. Die Proteine adsorbieren an die hydrophoben Liganden. Im Falle der HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose (High Performance) der Firma Amersham sind derivatisierte Phenyl-Gruppen an eine stark vernetzte Agarose-Matrix gekoppelt. Je hydrophober das aufzureinigende Protein ist, desto geringer muß die einzusetzende Salzkonzentration sein. Durch kontinuierliche Veringerung der Salzkonzentration können die Proteine von der Sälule eluiert werden, da der hydrophile Charakter der Proteine langsam wieder zunimmt.

Wasch-/Bindepuffer:		**Elutionspuffer:**	
20 mM	Tris/HCl pH 7,0	50 mM	Tris/HCl pH 7,0
2 M	NH_4SO_4		
2 mM	DTT	2 mM	DTT
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA

Die Säulen wurden nach Benutzung mit 1 M NaOH gespült und wieder in 20 % Ethanol überführt.

3.2.4.2 Umpufferung und Entsalzung von Proteinlösungen

In vielen Fällen ist es notwendig, Proteinlösungen für weitere Aufreinigungsschritte umzupuffern und so zu entsalzen. Proteine mit geringer Löslichkeit werden häufig in hoher Salzkonzentration aufgeschlossen und einige Affinitätschromatographien sind auf ein schmales pH-Optimum abgestimmt. Für Ionenaustauschchromatographien ist es jedoch essentiell, dass der pH-Wert und die Salzkonzentration des Puffers auf den pI des aufzureinigenden Proteins abgestimmt sind. Durch Dialyse oder die Verwendung von Entsalzungssäulen können Proteinlösungen entsalzt werden. Mittels der Dialyse durch eine semipermeable Membran können Proteine von kleineren Molekülen (Salzionen) getrennt werden. Die Ionen diffundieren in die umgebende Lösung geringerer Salzkonzentration bis zur Einstellung des Konzentrationsgleichgewichts. Entsalzungssäulen (HiPrep 26/10 Desalting oder PD-10) funktionieren grundsätzlich

wie Gelfiltrationssäulen. Die Poren des Säulenmaterials sind kleiner, um das Eindringen von Proteinen in die Gelmatrix zu verhindern. Salzionen und andere niedermolekulare Moleküle (Elutionssubstrate von Affinitätschromatographien) können in diese Poren eindringen und ihre Elution wird dadurch verzögert.

Die Säule wurde mit dem Zielpuffer äquilibriert und die Proteinlösung aufgetragen. Dann wurde mit dem Zielpuffer eluiert und das Eluat fraktioniert. Die HiPrep 26/10 Desalting-Säule von Amersham Pharmacia Biotech trennt 15 ml Proteinlösung von überschüssigem Salz ab. Zwei dieser Säulen wurden in Reihe geschaltet, um 30 ml Rohextrakt mit MnmA ohne Affintätsequenz in hoher Salzkonzentration (300 mM NaCl) in geeignete Puffer für An- oder Kationenaustauschchromatographie (100 mM NaCl) zu überführen. PD-10-Säulen können nur Proteinlösungen bis zu einem Volumen von 2,5 ml entsalzen. Sie eignen sich daher, um hochkonzentriertes, aufgereinigtes Protein von niedermolekularen Bindungspartnern zu trennen.

3.2.4.3 Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation

Eine einfache Methode zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen ist die Verwendung von so genannten Centricons. Auf ein Zentrifugenröhrchen ist eine Hülse gesteckt, in deren unterem Drittel eine Membran mit bestimmter Porengröße eingelassen ist. Diese Membran ist durchlässig für Wasser, Ionen und kleine Moleküle, aber nicht für Proteine, die größer als der Ausschluss der Membran sind. Durch Zentrifugation (3.000-4.500 x g, 4 °C), können Proteine auf diese Weise ankonzentriert werden.

In dieser Arbeit wurden Vivaspin Konzentratoren der Firma Vivascience verwendet.

3.2.4.4 Proteinverdau mit Proteasen

Das GST-hSGT-Fusionsprotein besitzt eine PreScission Protease-Schnittstelle. Durch einen Proteaseverdau können Affinitätssequenz und Zielprotein voneinander getrennt werden. Es gibt nun zwei Alternativen, um den PreScission Protease Verdau zu realisieren. Man schneidet das Fusionsprotein während der Affinitätschromatographie auf dem GSH-Sepharose-Säulenmaterial, wobei GST an der Gelmatrix gebunden bleibt, oder man schneidet nach der Elution von der GSH-Sepharosesäule und trennt den GST-Tag danach über eine Präparative Ausschlußchromatographie vom Zielprotein ab.

Bei der ersten Methode wurde der Rohextrakt über die GSH-Sepharosesäule in einer Einweg-Leersäule (Tropfsäule) gegeben und mit fünf Säulenvolumina gewaschen. Das Säulenmaterial wurde dann in ein Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurden 20 µl PreScission Protease pro mg hSGT-Protein zugegeben. Das Fusionsprotein wurde über Nacht bei 4 °C bei stetiger Durchmischung auf einem Taumelrollenmischer geschnitten. Nach dem Verdau wurde das Säulenmaterial zurück in die Einweg-Leersäule überführt, mit zwei Volumina Waschpuffer gespült und so geschnittenes hSGT eluiert und fraktioniert. Fraktionen aus Wasch- und Elutionsschritten wurden über SDS-PAGE analysiert.

Bei der zweiten Methode wurde dem Fusionsprotein aus der Elution der GSH-Sepharosesäule 20 µl PreScission Protease pro mg hSGT-Protein zugegeben und analog zur ersten Methode verdaut. Zur Trennung von hSGT, GST, GST-hSGT-Fusionsprotein und PreScission Protease wurde das Proteingemisch über eine HiPrep 26/60 Superdex 200 Säule von Amersham Pharmacia Biotech aufgereinigt. Das His-hSGT-Fusionsprotein besitzt eine Faktor Xa Protease-Schnittstelle.

Der His-Tag wird am besten nach der Verwendung der Ni-NTA-Sepharosesäule durch Faktor Xa Protease-Verdau abgetrennt. Das Fusionsprotein aus der Elution der Ni-NTA-Sepharosesäule wurde zuerst über eine Column PD-10 umgepuffert.

Faktor Xa-Puffer:

50mM Tris/HCl pH 8,0
100mM NaCl
1mM $CaCl_2$

Anschließend wuden zu 50 µg hSGT-Protein je 1 U Faktor Xa-Enzym zugegeben und die Ansätze bei verschiedenen Temperaturen über Nacht inkubiert.

3.2.5 Kristallisation von Proteinen

3.2.5.1 Kristallisationsansätze

Bei der Kristallisation eines Proteins wird mit Hilfe von Salzen, Puffern und Präzipitantien eine Proteinlösung in den übersättigten Zustand überführt. In diesem metastabilen Zustand gibt es zwei Möglichkeiten, wie ein Protein sich verhalten kann:

I. Es fällt aus, die Konzentration an gelöstem Protein sinkt dadurch drastisch ab. Dieser Vorgang ist stark exergonisch, da so der höchste Grad an Entropie erreicht werden kann.
II. Das Protein bildet Kristallisationskeime aus, aus denen richtige Proteinkristalle wachsen können. Dieser Prozeß geschieht in der Regel deutlich langsamer als die Präzipitation und ist auch nicht so energetisch günstig, da nicht die maximale Entropie erreicht wird.

In der Kristallographie wird nach Bedingungen gesucht, die den zweiten Fall ermöglichen. Dazu werden zu Beginn sog. „Initial Screens“ durchgeführt, um erste Kristallisationsbedingungen für ein Protein zu finden. Bei den Initial Screens handelt es sich um eine Sammlung von Eingangsbedingungen, die relativ häufig zur Kristallisation verschiedener Proteine geführt haben. Das aufgereinigte Protein wird dabei zu Anfang meist in einer Konzentration von 10 mg/ml getestet.

Sobald Bedingungen ausgemacht sind, die für eine Kristallisation günstig sind, wird in einem Raster um die Bedingungen herum optimiert. Dabei können die Konzentrationen der enthaltenen Salze, Puffer und Präzipitantien variiert werden, es können aber auch Substitutionen getestet werden.

Für die Kristallisation im sog. sitzenden Tropfen werden 24er-Ansatz-Kristallisationsplatten der Marke Cryschem-Plate verwendet, deren einzelne Kammern eine zentrale Säule mit darin liegender Vertiefung, dem sog. „well“, und ein darunter liegendes Reservoir besitzen. In das Reservoir wird eine Bedingung vorgelegt, die dann im Well mit dem Protein zu einem Tropfen vermischt wird. Es besteht also ein Konzentrationsgradient an Salzen und Präzipitantien zwischen Tropfen und Reservoir, da der Tropfen neben dem Protein nur 50 % der Salz- und Präzipitans-Konzentration des Reservoirs enthält. Durch Diffusion des Wassers aus dem Tropfen in das Reservoir wird der Tropfen im Well nun langsam eingeengt und das enthaltene Protein ankonzentriert. Wird dabei der Punkt der Übersättigung überschritten. Es kann als Ausweg aus diesem metastabilen Zustand spontan eine Proteinkristallisationskeimung stattfinden.

Zunächst werden 500 µl der zu testenden Kristallisationsbedingung in das Reservoir pipettiert. Aus diesem wird nun 1 µl entnommen und in den Well überführt. Anschließend wird 1 µl der Proteinlösung in den Well pipettiert und gut gemischt. Schließlich wird der Well mit Klarsichtklebeband verschlossen, um einem Austrocknen vorzubeugen. Der Tropfen wird in der ersten Woche täglich kontrolliert. Danach wird

einmal pro Woche bis einschließlich vier Wochen nach dem Pipettieren der Bedingung kontrolliert. Später wird der Tropfen einmal im Monat überprüft. Bilder der verschiedenen Tropfen werden mit einer Digitalkamera, die auf ein Binokular aufgesetzt wird, aufgenommen und am PC bearbeitet (Kontrast, Helligkeit, Gamma).

3.2.5.2 „Macro-Seeding“ und „Micro-Seeding“ zur Verbesserung von Kristall-wachstum und Kristallordnung

Haben sich erste, kleine Kristalle entwickelt, die aber wegen einer zwischenzeitlich zu geringen Proteinkonzentration im Tropfen nicht mehr Weiterwachsen, so kann durch „Macro-Seeding“ das Kristallwachstum fortgesetzt werden. Die Kristallisationskeime aus dem ersten Tropfen werden in einen neuen Proteintropfen überführt, sie werden „gesät“. Deren Inhalte sind analog zum ersten, mit einer Ausnahme: Entweder die Präzipitans- oder die Proteinkonzentration müssen in diesen Tropfen gegenüber dem ersten verringert sein, da es sonst zu einer sofortigen Präzipitation des Proteins in den neuen Tropfen kommen kann. Kristalle mit ungünstiger innerer Ordnung, d.h. sie sind z.B. von unregelmäßiger Gestalt oder sie haben eine geringe Auflösung im Röntgendiffraktometer, können durch „Micro-Seeding“ verbessert werden. Bruchstücke dieser Kristalle können in verdünnten Lösungen (z.B. 1:200 in einer frischen Proteinlösung) Kristallisationskeime für Kristalle höherer Ordnung sein. Beim „Micro-Seeding“ werden die Kristallisationskeime wie beim Macro-Seeding in neue Tropfen überführt. Auch hier gilt, dass entweder Präzipitans- oder Proteinkonzentration verringert sein sollten.

3.2.5.3 Röntgenbeugungsexperimente

Für die Durchführung eines Röntgenbeugungsexperimentes mit einem Proteinkristall wird dieser in einem Röntgendiffraktometer mit Röntgenstrahlen beschossen, die durch die Elektronen im Kristallgitter abgelenkt werden. Da im Kristallgitter sich jede Struktur, die größer als die Einheitszelle ist, sich durch Translation oder Additionen dieser Einheitszelle erzeugen lässt, und dadurch eine unendliche Periodizität entsteht, werden die Röntgenstrahlen an theoretischen Ebenen durch den Kristall gebeugt. Das aus einem Röntgenbeugungsexperiment resultierende Beugungsmuster stellt daher viele

einzelne Punkte dar, die durch eine reverse Fourier-Transformation die Raumkoordinaten der theoretischen Ebenen, genauer die Schnittstellen dieser Ebenen mit den drei Raumachsen, wiedergeben, an denen der Röntgenstrahl gebeugt wurde. So kann aus einem Datensatz mit vielen solcher Röntgenbeugungsmuster eine so genannte Elektronendichtekarte der Einheitszelle im Kristall erstellt werden. In dieses wird durch PC-Analysemethoden die Aminosäuresequenz des Proteins eingebaut, so dass schließlich eine dreidimensionale Struktur des untersuchten Proteins auf atomarer Ebene dargestellt werden kann.

Die Röntgenbeugungsexperimente wurden wie folgt durchgeführt: Der Proteinkristall wurde mit einer kleinen Schlinge aus dem Kristallisationstropfen entnommen und vor den Strahlengangverschluss des Diffraktometers gespannt. Dabei wurde der Kristall in einem Stickstoffgasstrahl gekühlt und anschließend der Röntgenstrahlung ausgesetzt. Der Kristall rotierte dreidimensional um vorher definierte Gradzahlen, um so durch die Drehung der theoretischen Ebenen durch den Kristall ein Beugungsspektrum zu erhalten. Für Testzwecke, also um zu verifizieren, ob der Kristall aus Protein oder Salz besteht, wurde er um 5 Grad binnen einer Minute gedreht. Das Beugungsmuster wurde über einen strahlungssensitiven Schirm detektiert und am PC ausgewertet.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte, wobei im ersten Teil erläutert wird, wie die Umklonierung von hSGT aus pET16b in pET28a bzw. pGEX6P1+1 durchgeführt wurde.
Im zweiten Teil werden unterschiedliche Expressions- und Aufreinigungsstrategien beschrieben, um das hSGT-Protein in ausreichender Menge und Reinheit für die Kristallisation zu gewinnen.
Der dritte Teil stellt schließlich die Kristallisationsversuche mit aufgereinigtem hSGT-Protein bzw. His-hSGT-Fusionsprotein dar.

4.1 Umklonierung von hSGT aus pET16b in pET28a und pGEX6P1+1

Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen - die Kristallisation des hSGT-Proteins - wurden zwei unterschiedliche Wege eingeschlagen. Zum einen die Herstellung von His-hSGT-Fusionsprotein, zum anderen wurde hSGT-Protein ohne Tag zur Kristallisation verwendet. Der für hSGT kodierende Genabschnitt (Accession: NM_003021) war bereits über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I in den Vektor pET16b kloniert worden und wurde mir für die Diplomarbeit von Herrn R. Ficner (Molekulare Strukturbiologie, Göttingen) zur Verfügung gestellt.
Unter Zuhilfenahme des pET16b-Vektors mit integriertem hSGT-kodierendem Genabschnitt, konnte ein Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag und C-terminalem Zielprotein mit dazwischenliegender Faktor Xa-Schnittstelle exprimiert werden. Wie unter Abschnitt 4.2.1.6 gezeigt, konnte dieses Fusionsprotein nicht über die Faktor Xa-Schnittstelle in Zielprotein und His-Tag gespalten werden. Aus diesem Grund wurde der für hSGT kodierende Genabschnitt (Accession: NM_003021), mit dem Ziel der späteren Spaltung von Zielprotein und Tag, in zwei weitere Vektoren kloniert. Einerseits in einen pET28a-Vektor mit N-terminalem His-Tag und einer, zwischen diesem Tag und dem Zielprotein liegenden, Thrombin-Schnittstelle. His-Tag und Thrombin-Schnittstelle sind durch einen kurzen Linker (Ser-Ser-Gly) voneinander getrennt. Andererseits wurde ein Konstrukt aus pGEX-6P1+1 (modifizierter pGEX-6P1-Vektor, siehe Abschnitt 3.1.5) und hSGT-Gensequenz hergestellt. In diesem Fall liegt zwischen dem N-terminalen GST-Tag und der Sequenz für das Zielprotein eine PreScission-Protease-

Schnittstelle. PET16b-hSGT wurde in XL1-Blue vermehrt, anschließend über Midi-Präparation aus den Zellen extrahiert, und mit *Nde*I und *Xho*I geschnitten. Die Spaltprodukte wurden anschließend in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, die gesuchte Bande aus dem Gel geschnitten (siehe Abbildung 4.1), sowie mittels des Qiagen Gel Extraction Kits aufgereinigt.

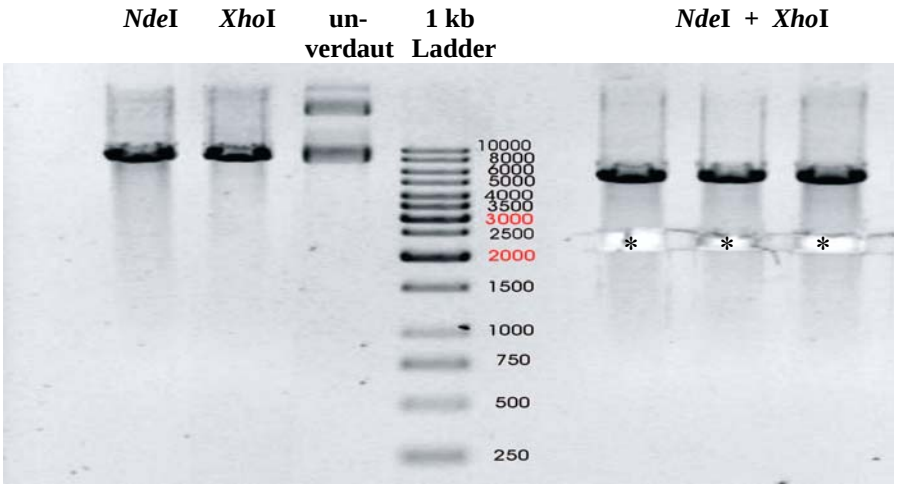


Abb. 4.1: Restriktionsverdau des Vektors pET16b mit inserierter hSGT-Gensequenz, mit den beiden Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I. In den ersten drei Spuren des 1%igen Agarosegels wurde, mit nur einem Enzym geschnittenes, bzw. ungeschnittenes pET16b/hSGT aufgetragen. In die letzten drei Spuren wurde mit *Nde*I und *Xho*I geschnittenes pET16b/hSGT aufgetragen. Das hSGT-Insert (ca. 2,2 kbp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Seine ehemalige Position ist an den Schatten der *Nde*I/*Xho*I-Spuren zu erkennen und durch Sterne gekennzeichnet.

Alternativ wurde zur Vermehrung des für hSGT kodierenden Genabschnittes eine PCR von pET16b-hSGT mit T7- Primern durchgeführt (siehe Abbildung 4.2). Nach Behandlung des PCR-Ansatzes mit dem Qiagen PCR Purification Kit wurde die amplifizierte DNA mit dem Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I geschnitten und die entstandenen Spaltprodukte in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die gesuchte Bande wurde aus dem Gel herausgeschnitten und unter Zuhilfenahme des Qiagen Gel Extraction Kits aufgereinigt.

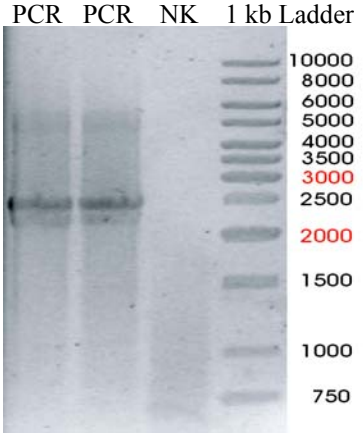


Abb. 4.2: PCR von pET16b/hSGT mit T7-Primern. In den ersten beiden Spalten des 1%igen Agarosegels kann man ein ca. 2,4 kbp großes PCR-Produkt erkennen. Die Größe von 2,4 kbp entspricht einem hSGT-Fragment mit zwei kurzen Stücken des pET16b-Vektors. Diese Vektor Stücke entstehen aus dem Abstand der T7-Primer von dem hSGT-Insert. In der dritten Spalte des Agarosegels wurde die PCR-Negativkontrolle (ohne DNA) aufgetragen

Die beiden Vektoren pET28a-90k und pGEX 6P1+1-60k wurden mir freundlicherweise von Herrn C. Gouloudis (Molekulare Strukturbiologie, Göttingen) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. In den Vektor pET28a war über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I bereits die Gensequenz, welche für U4/U6-90k (hprp3) kodiert, inseriert. In den Vektor pGEX 6P1+1 hingegen war die Gensequenz für U4/U6-60k (hprp4) als *Nde*I-*Xho*I-Fragment kloniert.

Die Vektoren pET28a und pGEX6P1+1 wurden ebenfalls in *E. coli* XL1-Blue vermehrt, mittels Midi-Präparation extrahiert und mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I behandelt. Anschließend wurden die Phosphorylgruppen der geschnittenen Enden des Vektors durch Zugabe von Calf intestinal alkaline Phosphatase (CIP) und einstündiger Inkubation bei 37°C entfernt, um einer Religation des Plasmids entgegenzuwirken. Nach der Auftrennung des Restriktionsansatzes in einem 1 %igen Agarosegel wurde jeweils die Vektor-DNA-Bande aus dem Agarosegel herausgeschnitten (siehe Abbildung 4.3 und 4.4) und die DNA mittels des Qiagen Gel Extraction Kits aufgereinigt.

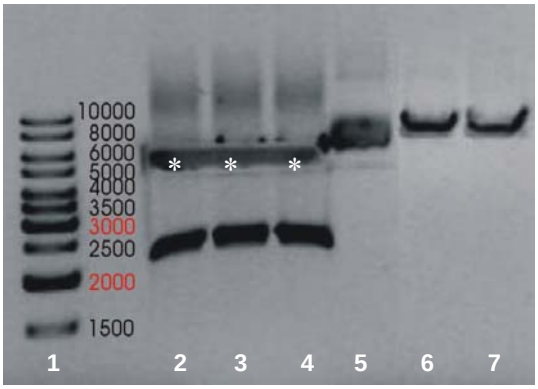


Abb. 4.3: Restriktionsverdau des Vektors pET28a mit inserierter hprp3-Gensequenz.
In den Spuren 2-4 des 1%igen Agarosegels kann man sowohl das, mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I herausgeschnittene hprp3-Fragment, mit einer Größe von ca. 2,5 kbp erkennen als auch die ehemaligen Positionen der aus dem Gel geschnittenen Verktor-Fragmente (ca. 5,5 kbp groß, markiert durch Sterne). In Spur 5 ist unverdauter Vektor aufgetragen und in den Spuren 6 und 7 jeweils einfach verdauter pET28a-Vektor.

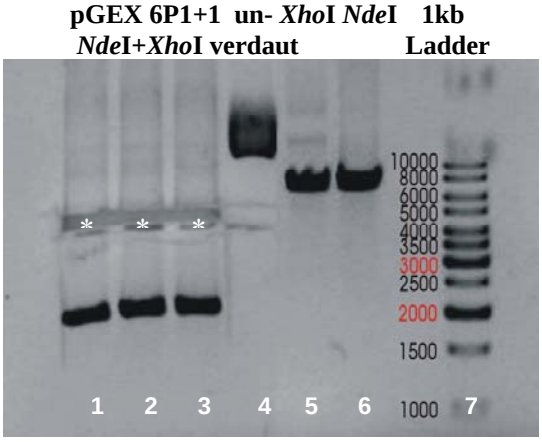


Abb. 4.4: Restriktionsverdau des Vektors pGEX6P1+1 mit inserierter hprp4-Gensequenz.
In den Spuren 1-3 des 1%igen Agarosegels kann man sowohl das, mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I herausgeschnittene hprp4-Fragment, mit einer Größe von ca. 2 kbp erkennen als auch die ehemaligen Positionen der aus dem Gel geschnittenen Verktor-Fragmente (ca. 5 kbp groß, markiert durch Sterne). In Spur 4 ist unverdauter Vektor aufgetragen und in den Spuren 5 und 6 jeweils einfach verdauter pGEX6P1+1-Vektor.

Nachdem sowohl das hSGT-Fragment als auch die Vektoren mit den selben Restriktionsenzymen verdaut wurden, konnten sie mit Hilfe einer T4-Ligase miteinander verknüpft werden. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL1-Blue transformiert, und der Transformationsansatz anschließend im Falle von pET28a auf einer LB-Agarplatte mit Kanamycin und in Falle von pGEX6P1+1 auf einer Platte mit Ampicillin ausplattiert. Die Umklonierung wurde sowohl durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I, als auch durch eine darauffolgende Sequenzierung verifiziert. Zum Ende dieser Arbeit waren die Transformanden mit dem pET28a-hSGT-Konstrukt noch nicht vollständig sequenziert.

4.2 Expression und Aufreinigung des hSGT-Proteins

Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, d.h. die Kristallisation des hSGT-Proteins, wurden zwei verschiedene Expressions- und Aufreinigungsstrategien verfolgt. Zum einen die Aufreinigung eines His-hSGT-Fusionsproteins, zum anderen die Herstellung von nicht getagtem hSGT-Protein. Schließlich war es unerlässlich jeweils eine zuverlässige Expressions- und Aufreinigungsstrategie zu entwickeln, um die für eine Kristallisation nötigen Proteinmengen herstellen zu können.

Um das hSGT-Protein ohne Affinitätssequenz ionenchromatographisch aufzureinigen, wurde pGEX6P1+1 als Expressionsvektor verwendet. Dieser Vektor besitzt zwischen der inserierten hSGT-Gensequenz und dem GST-Tag eine PreScission Protease-Schnittstelle. Über diese kann der GST-Tag von dem überexprimierten Protein abgetrennt werden. Das hSGT-Protein ohne Tag besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 34 kDa und besteht aus 313 Aminosäuren (siehe Anhang 8.1). Durch den kurzen Linker zwischen PreScission Protease-Schnittstelle und *Nde*I-Restriktionsschnittstelle erhöht sich die Länge des Proteins auf 322 Aminosäuren und das Molekulargewicht auf 35 kDa (siehe Anhang 8.1).

Für die Herstellung des His-hSGT-Fusionsproteins wurde pET16b als Expressionsvektor verwendet. Der His-Tag dieses Vektors besteht aus 10 Histidinen, und ist über einen kurzen Linker, inklusive Faktor Xa-Protease-Schnittstelle, mit dem inserierten Protein verknüpft. Das His-hSGT-Fusionsprotein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 37 kDa und besteht aus 334 Aminosäuren (siehe Anhang 8.1).

4.2.1 Expression und Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins über den pET16b-Expressionsvektor

4.2.1.1 Überexpression von His-hSGT-Fusionsprotein in *E. coli*

Zur Überexpression des humanen SGT-Proteins als His-hSGT-Fusionsprotein wurde der Vektor pET16b, welcher das Gen des hSGT-Proteins enthielt, in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3) transformiert. Nach Ausstrich auf entsprechende Markerplatten wurden die rekombinanten Bakterien zur Überexpression verwendet.

Für die Expression wurden jeweils 20 ml Vorkultur zu einem Liter LB-Medium mit Ampicillin gegeben. Die Expressionskultur wurde dann bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert, bis die Zellen eine OD_{600} von ca. 0,6 Adsorptionseinheiten erreichten. Anschließend wurden sie mit 0,5 mM IPTG induziert. In Vorversuchen zeigte sich, dass durch das Herabsenken der Wachstumstemperatur nach der Induktion von 37°C auf 20°C die Ausbeute an rekombinantem Protein deutlich erhöht werden konnte. Allerdings mussten die Zellen durch das temperaturbedingte verlangsamte Wachstum nach der Induktion für ca. 12 Stunden wachsen. Nach erreichen einer OD_{600} von 1,8 - 2 Adsorptionseinheiten wurden die Zellen geerntet.

Zur Überprüfung der Expression wurden kurz vor der Induktion und zum Zeitpunkt der Zellernte (= nach Induktion) je zwei Proben der Expressionskultur entnommen und die OD_{600} bestimmt. Anschließend wurden gleiche Mengen an Zellen in Laemmli aufgenommen und 5 Min. aufgekocht. Das Zelllysat wurde in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (siehe Abbildung 4.5).

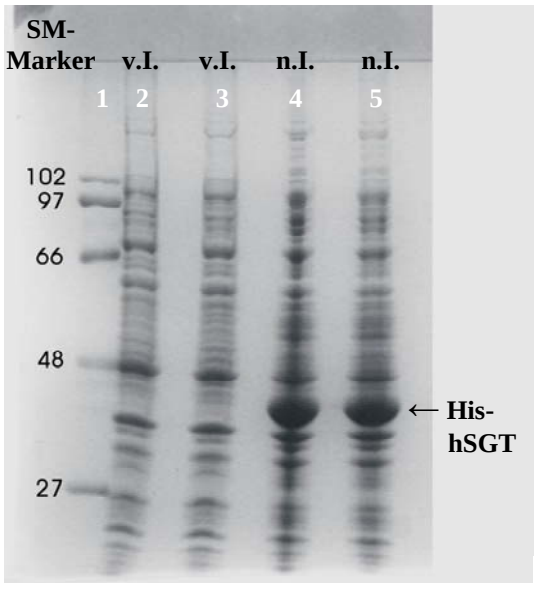


Abb. 4.5: Expressionsniveaus von His-hSGT-Fusionsprotein in BL21(DE3) nach Kultivierung in einem 10 Liter Bioreaktor
In Spur 1 des SDS-Gels wurde der SM-Marker (Self Made Marker) aufgetragen in Spur 2 und 3 die Proben vor Induktion (v.I.) und in die Spuren 3 und 4 die Proben zur Zeit der Zellernte (n.I.). Das His-hSGT-Fusionsprotein läuft bei einer Größe von 37 kDa (siehe Abschnitt 4.2). Die molekulare Masse der einzelnen Markerproteine ist in kDa angegeben. Der Pfeil kennzeichnet das hSGT-Protein, welches als His-hSGT-Fusionsprotein überexprimiert wurde.

Nach erfolgter Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Gel kann in dem induzierten Lysat ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kDa identifiziert werden. Dieses fehlt in den nichtinduzierten Zellen.

4.2.1.2 Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein nach Inkubation der Expressionskultur bei 37 °C nach Induktion

4.2.1.2.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein

Der erste Reinigungsschritt erfolgte über die HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säule nach der in Abschnitt 3.2.4.1.1 beschriebenen Methode. Für die Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins wurde ein Zellsediment aus 1 Liter Bakterienkultur re-suspendiert und die Zellen mit einer Kombination aus enzymatischer Lyse, Ultraschall und mechanisch, durch pneumatische Zelldesintegration (Fluidizer), aufgebrochen. In diesem Fall wurde die Expressionskultur nach der Induktion bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation wurden Überstand und Zellpellet getrennt. Das Fusionsprotein aus dem proteinreichen Zellüberstand wurde anschließend über eine HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säule aufgereinigt. Die Abbildung 4.6 zeigt ein typisches Chromatogramm einer solchen Aufreinigung.

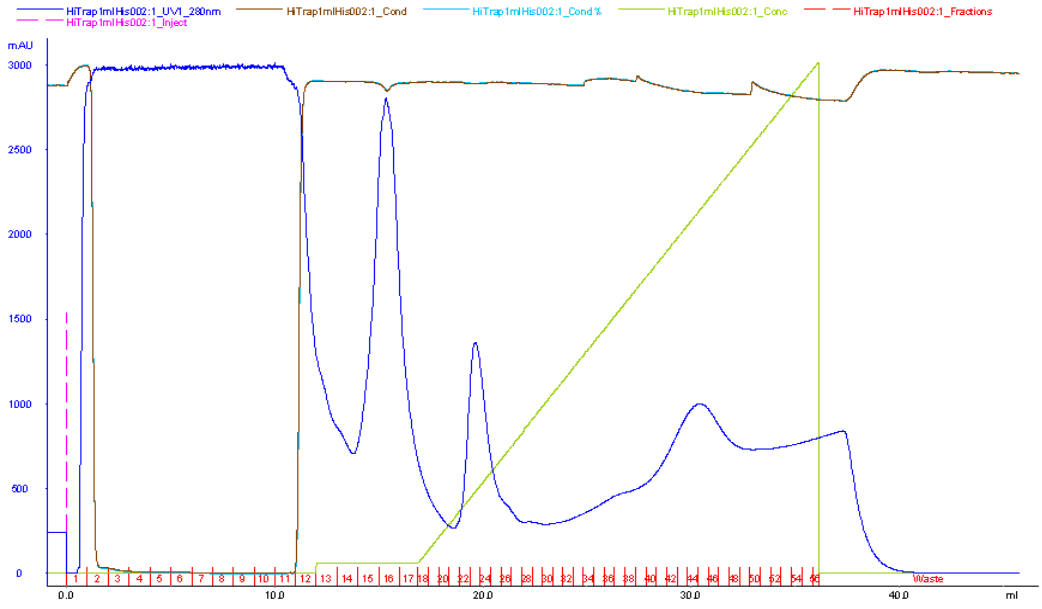


Abb. 4.6: Chromatogramm einer Affinitätschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Ni-NTA-Sepharose Säule.
Das His-hSGT-Fusionsprotein eluiert zwischen 250 und 280 mM Imidazol (Fraktionen 41-52). *E. coli* eigene Proteine mit mehreren Histidinen binden unspezifisch an die Säule, werden aber erwartungsgemäß bereits durch geringe Mengen an Imidazol (20 mM) eluiert (Fraktionen 14-26). Blau: UV-Absorption bei 280 nm, Braun: relative Leitfähigkeit, Grün: Elutionsgradient: 20-400 mM Imidazol. Einige Fraktionen wurden zur Analyse auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe Abb. 4.7).

Die blaue Kurve zeigt die UV-Absorption (280 nm) in Korrelation zum Volumen der eluierten Probe. Die grüne Kurve zeigt den Elutionsgradienten in Prozent Imidazol an. Das hSGT-His-Tag-Fusionsprotein eluiert zwischen 250 und 280 mM Imidazol.

Die einzelnen Fraktionen aus der Elution von der Ni-NTA-Sepharose Säule wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 4.7). Die beiden ersten Peaks (zwischen den Fraktionen 14 und 26) enthielten unspezifisch gebundene *E. coli*-Proteine. Das hSGT-His-Tag-Fusionsprotein eluierte zwischen 250 und 280 mM Imidazol (Fraktionen 41-52). Unterhalb der Fusionsprotein-Bande kann man zwei weitere Proteinbanden bei etwa 32 und 35 kDa erkennen.

Um die Löslichkeit des Proteins zu analysieren, wurden die bei der Herstellung des Rohextraktes anfallenden Zelltrümmer ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht. Das His-hSGT-Fusionsprotein war löslich und zum größten Teil im Überstand vorhanden (siehe Abbildung 4.7).

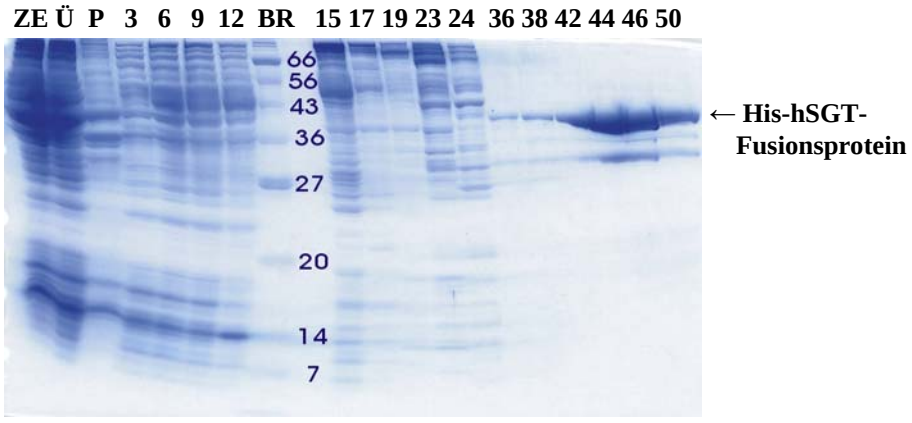


Abb. 4.7: SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Ni-NTA-Sepharose Säule
Die Zahlen bezeichnen die Fraktionen (siehe Abb. 4.6). Das Fusionsprotein ist mit einem Pfeil markiert und läuft bei ca. 37 kDa. Zusätzlich erscheinen in den Elutionsfraktionen zwei weitere Proteine (ca. 32 und 35 kDa) unterhalb der Fusionsproteinbande. (BR = Marker, broad range, ZE = Zellextrakt nach Aufschluss, Ü = Überstand, P = Pellet, 12,5 %iges SDS-Gel).

Die Elutionsfraktionen 41-52 wurden vereinigt und für die anschließende Gelfiltration auf 2 mg/ml ankonzentriert (siehe Abschnitt 3.2.4.3). Die Ausbeute an hSGT-His-Tag-Fusionsprotein betrug nach diesem Reinigungsschritt im Schnitt 50 mg pro Liter Expressionskultur.

4.2.1.2.2 Anionenaustauschchromatographie über ResourceQ zur Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins nach vorangegangener Affinitätschromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde ein Puffer mit einem eingestellten pH-Wert von 7,0 verwendet. Das His-hSGT-Fusionsprotein hat einen theoretischen pI von ca. 5,6 (siehe Anhang 8.1).

Die Aufreinigung des Fusionsproteins über die ResourceQ erfolgte wie unter Punkt 3.2.4.1.2 beschrieben. Ziel dieses Aufreinigungsschrittes war die Abtrennung der zwei, auf dem SDS-Gel (siehe Abbildung 4.7) unterhalb der Fusionsproteinbande zu erkennenden Proteine (32 und 35 kDa groß). Hierzu wurde über Affinitätschromatographie vorgereinigtes His-hSGT-Fusionsprotein über eine Column PD-10 umgepuffert (siehe Abschnitt 3.2.4.4), und anschließend auf eine ResourceQ-Säule aufgetragen (siehe Abbildung 4.8).

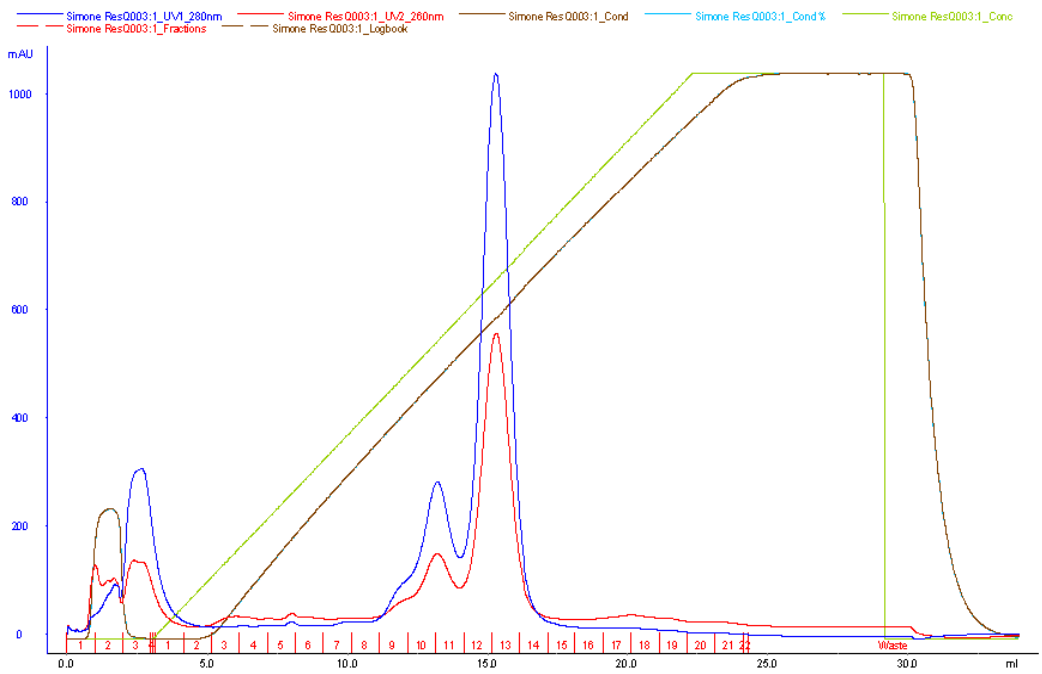


Abb. 4.8: Chromatogramm einer Anionenaustauschchromatographie des His-hSGT-Fusionsproteins über eine ResourceQ-Säule
Im Chromatogramm sind zwei Hauptpeaks zu erkennen, wobei der zweite Peak doch deutlich größer als der erste ist. Einige Fraktionen wurden zur Analyse auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe Abb. 4.9). Blau: UV-Absorption bei 280 nm, Rot: UV-Absorption bei 260 nm, Braun: relative Leitfähigkeit, Grün: Elutionsgradient: 0-500 mM NaCl.

Zur Analyse des Säulenlaufes wurden einige Fraktionen auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 4.9).

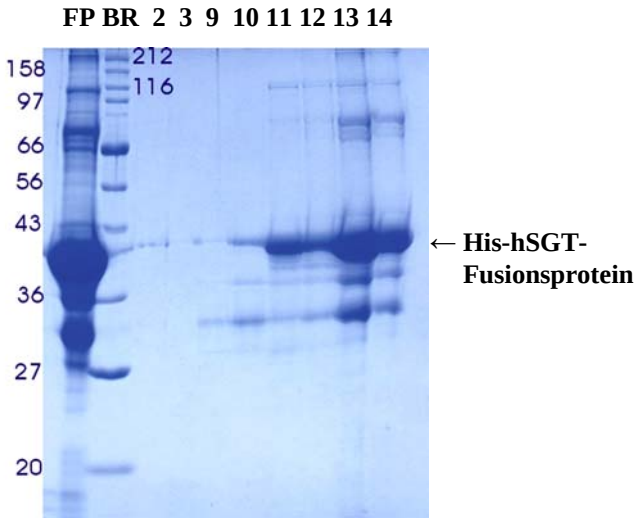


Abb. 4.9: SDS-PAGE der Anionenaustauschchromatographie des His-hSGT-Fusionsproteins über eine ResourceQ-Säule
Die Zahlen bezeichnen die Fraktionen (siehe Abb. 4.8). FP bezeichnet das Fusionsprotein vor dem Auftrag auf die ResourceQ-Säule, BR bezeichnet den broad range Marker. Die blauen Zahlen beziehen sich auf die Markerbanden. Die Elution des His-hSGT-Fusionsproteins findet hauptsächlich in den Fraktionen 10-14 statt.

Auf dem 12,5 %igen SDS-Gel kann man deutlich erkennen, dass die zwei zusätzlichen Banden unterhalb der hSGT-His-Tag-Fusionsproteinbande nicht über diesen Reinigungsschritt abzutrennen waren. Auch wenn es auf dem Chromatogramm des ResourceQ-Säulenlaufes aussieht, als wären zwei Proteine in den beiden Hauptpeaks voneinander getrennt worden, zeigt die Auftrennung der Elutionsfraktionen in einem SDS-Gel, dass in allen Fraktionen die drei Proteinbanden wiederzufinden sind. Aus diesem Grund wurde bei späteren Aufreinigungen auf diesen Reinigungsschritt verzichtet, um Verluste an Protein während der Aufreinigung gering zu halten.
Auch durch eine Anionenaustauschchromatographie über eine Mono Q HR 16/10 Säule und durch eine Hydrophobe Interaktionschromatographie des hSGT-Proteins mittels einer Phenylsepharose-Säule (HiLoad 26/10) ließen sich die beiden 32 und 35 kDa großen Proteine nicht von dem hSGT-Protein abtrennen. Um die Proteinverluste während der Aufreinigung gering zu halten, wurde auch auf diese Reinigungsschritte im weiteren Verlauf verzichtet.

4.2.1.2.3 Ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins nach vorheriger Affinitätschromatographie

Für die präparative, ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins aus der Affinitätschromatographie wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.1.3 beschrieben, verfahren. Für diesen Reinigungsschritt wurde eine Superdex-200-Säule

(HiLoad™ 26/60) verwendet. Durch die Verwendung einer Gelfiltration als letzten Reinigungsschritt, kann das zu kristallisierende Protein zeitgleich in einen entsprechenden Puffer überführt werden. Dieser Schritt erspart eine abschließende Umpufferung/Dialyse des Proteins. Von dem His-hSGT-Fusionsprotein wurde nach der Ankonzentrierung auf 2 mg/ml (siehe Abschnitt 4.2.1.2) 1 ml auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe Abbildung 4.10). Die blaue Kurve entspricht der UV Absorption bei 280 nm und die rote Kurve der Leitfähigkeit.

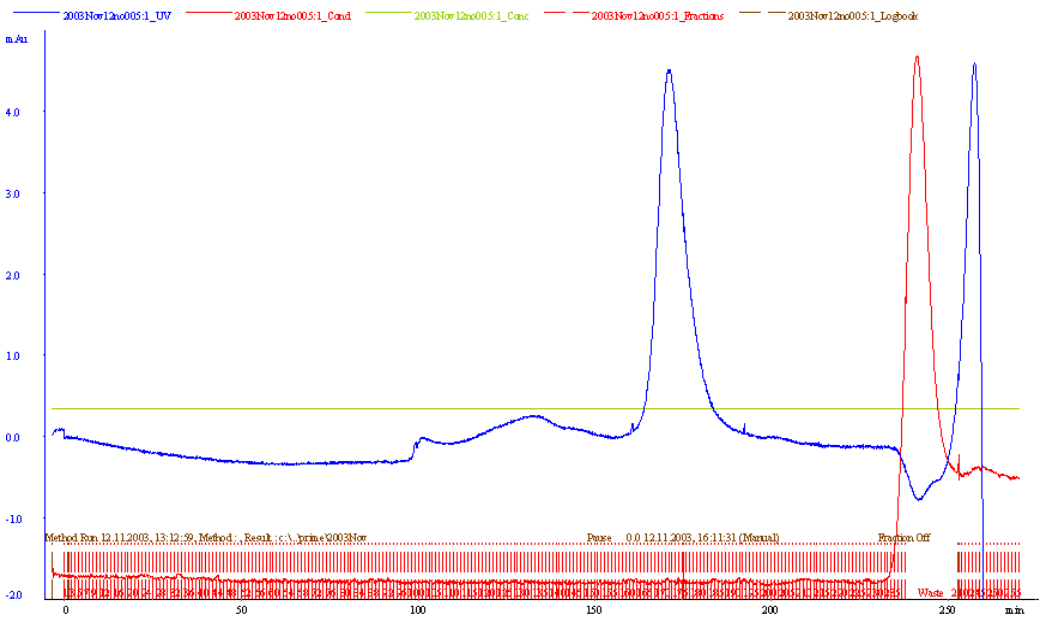
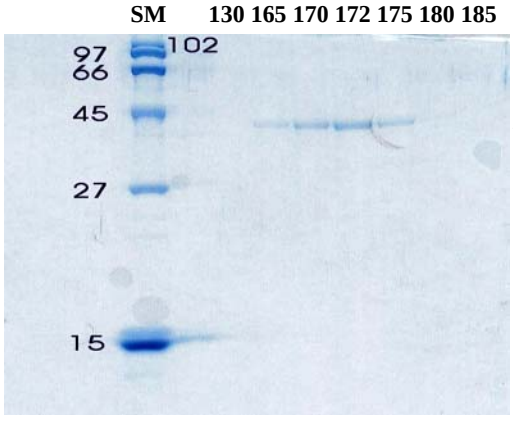


Abb. 4.10: Elutionsprofil einer Gelfiltration von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex-200 (26/60)-Säule
In diesem Versuch wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 165-175 enthalten das hSGT-His-Tag-Fusionsprotein (siehe Abb. 4.11). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: Leitfähigkeit.



← **His-hSGT-Fusionsprotein**

Abb. 4.11: SDS-PAGE der Fraktionen der Ausschlusschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex 200 (26/60)
Die Fraktionen 165-175 des Hauptpeaks enthalten das Fusionsprotein, die zwei in Abb. 4.7 darunterliegenden Proteinbanden sind auf diesem Gel nicht mehr zu erkennen. Der kleinere Vorpeak um Fraktion 130 ist auf dem 12,5 %igen SDS-Gel nicht als Proteinbande zu erkennen. BR = broad range Marker, die Zahlen entsprechen den Fraktionen des Superdex 200 (26/60)-Gelfiltrationslaufes (siehe Abb. 4.10)

Die Elution nach ca. 170 ml entspricht einem etwa 135 kDa großem tetramerem His-hSGT-Fusionsprotein. Eine genaue Aussage zu dem Oligomerisierungsgrad der eluierten Proteine ist nur schwer zu treffen, da es sich immer noch um eine Mischung verschiedengroßer Proteine handelt (siehe Abschnitt 4.2.1.6). Das Eluat von der Superdex-S200 (26/60)-Gelfiltrationssäule wurde durch SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 4.11). Auf dem 12,5 %igem Gel ist unterhalb der His-hSGT-Fusionsprotein-Bande keine weitere Proteinbande zu erkennen. Dies kann aber auch an der geringen Konzentration des hSGT-Fusionsproteins in den Fraktionen nach der Gelfiltration liegen. In der Abbildung 4.9 kann man die sehr viel stärkere Ausprägung der hSGT-Fusionsproteinbande im Vergleich zu den beiden anderen darunter liegenden Proteinen erkennen. In Fraktion 11 z.B. sind die zwei zusätzlichen Proteinbanden auf dem SDS-Gel deutlich schwächer ausgeprägt. Das restliche His-hSGT-Fusionsprotein aus den gepoolten Elutionsfraktionen 41-52 nach der Affinitätschromatographie wurde ebenfalls über Ausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Ausbeute an Fusionsprotein betrug nach dem Gelfiltrationsschritt ca. 15 mg pro Liter Expressionskultur. Die Fraktionen mit dem Fusionsprotein wurden vereinigt und das Protein auf 5 mg/ml ankonzentriert. Es konnte somit für Kristallisationsversuche verwendet werden (siehe Abschnitt 4.3).

4.2.1.3 Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein nach Inkubation der Expressionskultur bei 20 °C nach Induktion

Nach einer Inkubation der Expressionskultur nach der Induktion bei 20 °C statt 37 °C ergibt sich während der Gelfiltration ein gänzlich anderes Bild. Für diesen Versuch wurde die Anzucht der Expressionskultur in einem 10 l Bioreaktor durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.3.6.2).

4.2.1.3.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein

Der erste Reinigungsschritt erfolgte über die HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säule nach der in Abschnitt 3.2.4.1.1 beschriebenen Methode. Für die Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins wurde ein Zellpellet aus 1 Liter Bakterienkultur aus dem Fermenter resuspendiert und die Zellen mit einer Kombination aus enzymatischer Lyse, Ultraschall und mechanisch, durch pneumatische Zelldesintegration (Fluidizer), aufgebrochen. Nach Zentrifugation wurden Überstand und Zellpellet getrennt. Das Fusionsprotein aus dem proteinreichen Zellüberstand wurde anschließend über eine

HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säule aufgereinigt. Die Abbildung 4.12 zeigt ein typisches Chromatogramm einer solchen Aufreinigung.

Die blaue Kurve zeigt die UV-Absorption (280 nm) in Korrelation zum Volumen der eluierten Probe. Die grüne Kurve zeigt den Elutionsgradienten in Prozent Imidazol an. Das hSGT-His-Tag-Fusionsprotein eluiert bei etwa 250 mM Imidazol.

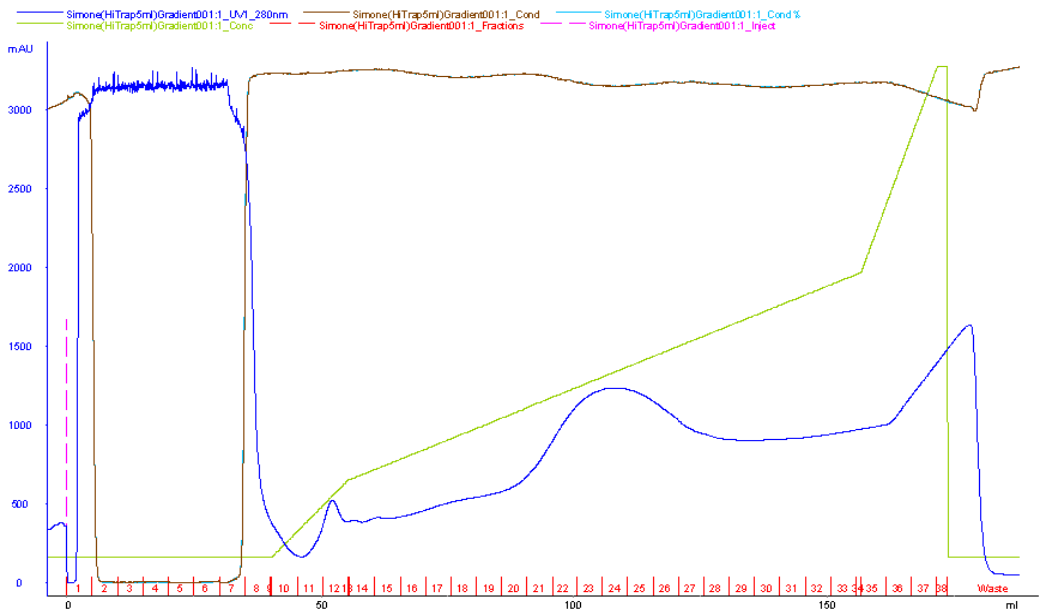


Abb. 4.12: Chromatogramm einer Affinitätschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Ni-NTA-Sepharose Säule.
E. coli eigene Proteine mit mehreren Histidinen binden unspezifisch an die Säule, werden aber erwartungsgemäß bereits durch den ersten Gradientenschritt 0-120 mM Imidazol eluiert (Fraktionen 11-12). Das His-hSGT-Fusionsprotein eluiert im zweiten Gradientenschritt von 120-360 mM Imidazol bei etwa 250 mM Imidazol (Fraktionen 18-30). Blau: UV-Absorption bei 280 nm, Braun: relative Leitfähigkeit, Grün: Elutionsgradient: 20-400 mM Imidazol. Einige Fraktionen wurden zur Analyse auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe Abb. 4.13).

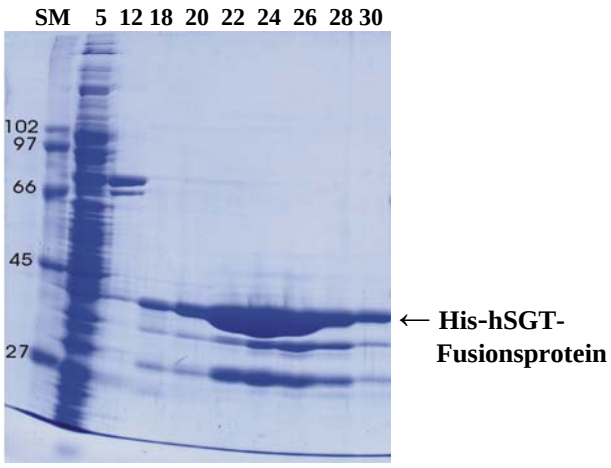


Abb. 4.13: SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Ni-NTA-Sepharose Säule
Die Zahlen bezeichnen die Fraktionen (siehe Abb. 4.12). Das Fusionsprotein ist mit einem Pfeil markiert und läuft bei ca. 37 kDa. Zusätzlich erscheinen in den Elutionsfraktionen zwei weitere Proteine (ca. 32 und 35 kDa) unterhalb der Fusionsproteinbande. (SM = self made Marker, 12,5 %iges SDS-Gel).

Die einzelnen Fraktionen aus der Elution von der Ni-NTA-Sepharose Säule wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 4.13). Der erste Peak (Fraktionen 11 und 12) enthielten unspezifisch gebundene *E. coli*-Proteine. Das hSGT-His-Tag-Fusionsprotein eluierte bei etwa 250 Imidazol (Fraktionen 18-30). Unterhalb der Fusionsprotein-Bande kann man zwei weitere Proteinbanden bei etwa 32 und 35 kDa erkennen

Die Elutionsfraktionen 18-30 wurden vereinigt und für die anschließende Gelfiltration auf 20 mg/ml ankonzentriert (siehe Abschnitt 3.2.4.3). Die Ausbeute an hSGT-His-Tag-Fusionsprotein betrug nach diesem Reinigungsschritt im Schnitt 65 mg pro Liter Expressionskultur.

4.2.1.3.2 Ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins nach vorheriger Affinitätschromatographie

Für die präparative, ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins aus der Affinitätschromatographie wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.1.3 beschrieben, verfahren. Für diesen Reinigungsschritt wurde eine Superdex-200-Säule (HiLoad™ 26/60) verwendet. Von dem His-hSGT-Fusionsprotein wurde nach der Ankonzentrierung auf 20 mg/ml (siehe Abschnitt 4.2.1.2) 1,5 ml auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe Abbildung 4.14).

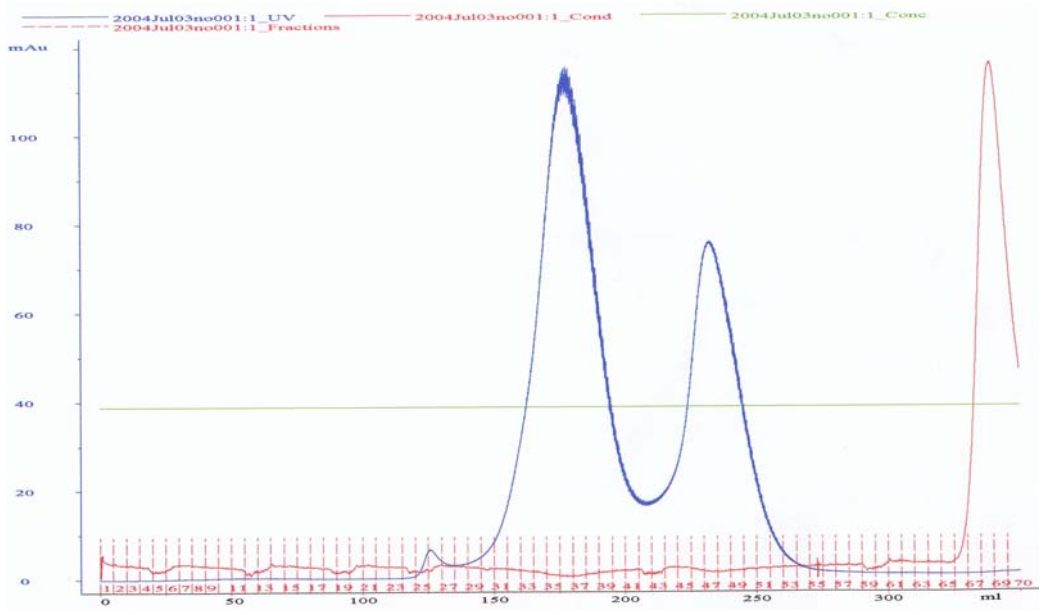


Abb. 4.14: Elutionsprofil einer Gelfiltration von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex-200 (26/60)-Säule
In diesem Versuch wurden 5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 31-51 enthalten das His-hSGT-Fusionsprotein (siehe Abb. 4.15). Die Proteine in den beiden Hauptpeaks unterscheiden sich hinsichtlich ihres Oligomerisierungsgrades (1. Peak = Oligomer, 2. Peak = Dimer). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: Leitfähigkeit.

Die blaue Kurve entspricht der UV Absorption bei 280 nm und die rote Kurve der Leitfähigkeit. Das Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes zeigt 2 Hauptpeaks. Nach der Analyse der Fraktionen in einem 12,5 %igen SDS-Gel kann man erkennen, dass in beiden Peaks das His-hSGT-Fusionsprotein eluiert (siehe Abbildung 4.15). Die berechnete Größe der Proteine aus dem ersten Peak entspricht oligomerisiertem Fusionsprotein mit einer berechneten Größe von ca. 135 kDa. Dies würde bei einer Größe des Fusionsproteins von etwa 36 kDa einem Tetramer entsprechen. Die berechnete Größe der Proteine aus dem zweiten Peak entsprechen dimerisiertem His-hSGT-Fusionsprotein.

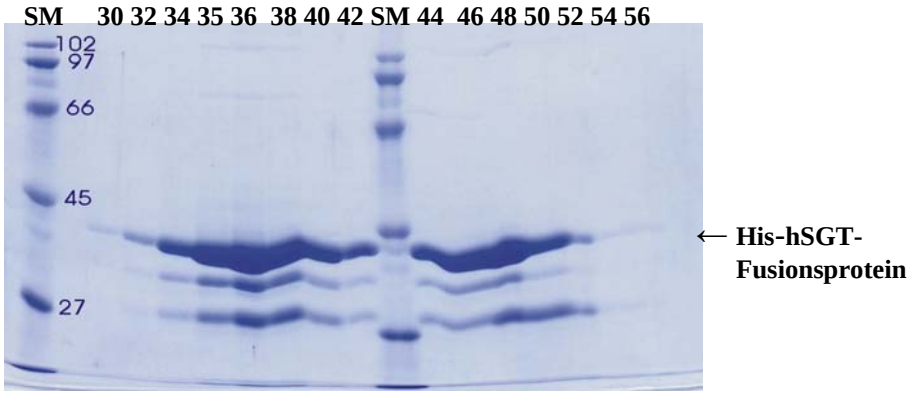


Abb. 4.15: SDS-PAGE der Fraktionen der Ausschlusschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex 200 (26/60)
Die Fraktionen 32-52 enthalten das Fusionsprotein, die zwei in Abb. 4.13 darunterliegenden Proteinbanden sind auch auf diesem Gel gut zu erkennen. SM = self made Marker, die Zahlen entsprechen den Fraktionen des Superdex 200 (26/60)-Gelfiltrationslaufes (siehe Abb. 4.14)

Nach der Aufreinigung von His-hSGT-Fusionsprotein nach einer Inkubation der Expressionskultur bei 37 °C konnte nur oligomerisiertes Fusionsprotein erhalten werden. Wurde die Expressionskultur aber bei 20 °C bis zur Ernte der Zellen inkubiert, konnte auch dimerisiertes Fusionsprotein von der Gelfiltrationssäule eluiert werden. Dieses dimerisierte Fusionsprotein wurde auf eine Konzentration von 16 mg/ml ankonzentriert und für Kristallisationsversuche eingesetzt (siehe Abschnitt 4.3).

4.2.1.4 Ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins unter Hochsalz-Bedingungen

Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, eluiert das His-hSGT-Fusionsprotein von der Superdex 200 (26/60)-Säule in zwei Hauptpeaks. Die Proteine im ersten Peak entsprechen oligomerisiertem His-hSGT-Fusionsprotein, die im zweiten Peak dimerisiertem Fusionsprotein. Mit diesem Versuch soll getestet werden, ob sich die Oligomere und Dimere aus His-hSGT-Fusionsprotein durch hohe Salzkonzentrationen (1 M NaCl) in ihre Untereinheiten aufspalten lassen. Die Wirkung von Hochsalz kann zum einen durch den

Ionenaustauscheffekt erklärt werden, wobei die Ionen des Salzes geladene Proteinreste verdrängen. Andererseits kann die steigende Ionenstärke auch die, zur Bindung notwenigen, elektrostatischen Wechselwirkungen schwächen.

Für die präparative, ausschlusschromatographische Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins unter Hochsalzbedingungen, wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.1.3 beschrieben, verfahren. Allerdings wurde dem Elutionspuffer 1 M NaCl zugegeben. Vor dem Auftrag auf die Superdex S200 (10/30)-Säule wurde das His-hSGT-Fusionsprotein ebenfalls in einen Puffer mit entsprechender Salzkonzentration überführt.

Für die Superdex S200 (10/30) wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die Auswertung dieser Kalibrierung ist im Anhang nachzuschlagen (siehe Anhang 8.4). Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, eluiert das His-hSGT-Fusionsprotein unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl) ebenfalls in 2 Hauptpeaks von der Superdex S200 (10/30)-Säule. Die Proteine im zweiten Peak eluieren nach ca. 12,5 ml, dies würde laut Kalibrierung einem Molekulargewicht von ungefähr 77 kDa entsprechen, d.h. das His-hSGT-Fusionsprotein liegt nach der Hochsalzgelfiltation mit 1 M NaCl zu einem Teil als Dimer vor. Die Proteine im ersten Peak eluieren schon nach etwa 8 ml. Dies entspricht noch dem Ausschlussvolumen der Säule und würde laut Kalibrierung einer Proteingröße von etwa 630 kDa entsprechen.

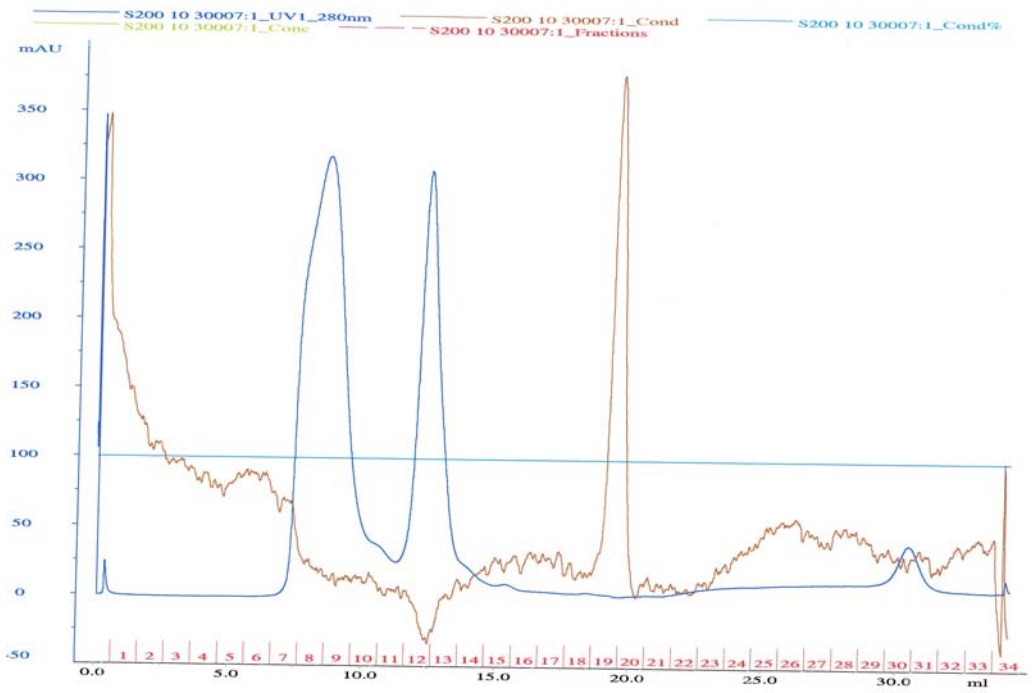


Abb. 4.16: Elutionsprofil einer Gelfiltration von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex-200 (10/30)-Säule unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl)
Die beiden Hauptpeaks stellen oligomerisiertes His-hSGT-Fusionsprotein dar, wobei sie sich allerdings in ihrem Oligomerisierungsgrad unterscheiden. Blau: UV-Absorption bei 280 nm, Braun: relative Leitfähigkeit

Im Vergleich mit dem Elutionsprofil der Gelfiltration des His-hSGT-Fusionsproteins unter „Normalsalz"-Bedingungen (siehe Abbildung 4.14) haben sich die Verhältnisse zwischen oligomerisiertem und dimerisiertem Fusionsprotein nach Hochsalzbehandlung nicht signifikant geändert. Die Größe der Proteine aus dem zweiten Peak entsprechen 77 kDa und damit dimerisiertem Fusionsprotein. Die eluierten Proteine aus dem ersten Peak dagegen sind laut Kalibrierung etwa 630 kDa groß. Auch weiterführende Versuche mit einer Erhöhung der Salzkonzentration auf 2M NaCl bzw. Austausch von 1 M NaCl gegen 1 M NH_4SO_4 zeigten nahezu identische Resultate. Die erhoffte Überführung von oligomerisiertem His-hSGT-Fusionsprotein in monomeres bzw. dimerisiertes Fusionsprotein blieb aus. Hochsalzbehandlung scheint eher kontraproduktiv zu sein, da vorher tetrameres Fusionsprotein nach Hochsalzbehandlung heterooligomere Komplexe aus etwa achtzehn SGT-Proteinen bildet.

Das Eluat von der Gelfiltrationssäule wurde mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 4.17). In Abbildung 4.17 kann man unter der His-hSGT-Fusionsproteinbande wieder sehr deutlich zwei weitere Banden erkennen, mir Größen von 35 und 32 kDa. Auch höhere Salzkonzentrationen (bis zu 2 M NaCl) können diese Proteine während eines Gelfiltrationslaufes nicht von dem His-hSGT-Fusionsprotein trennen.

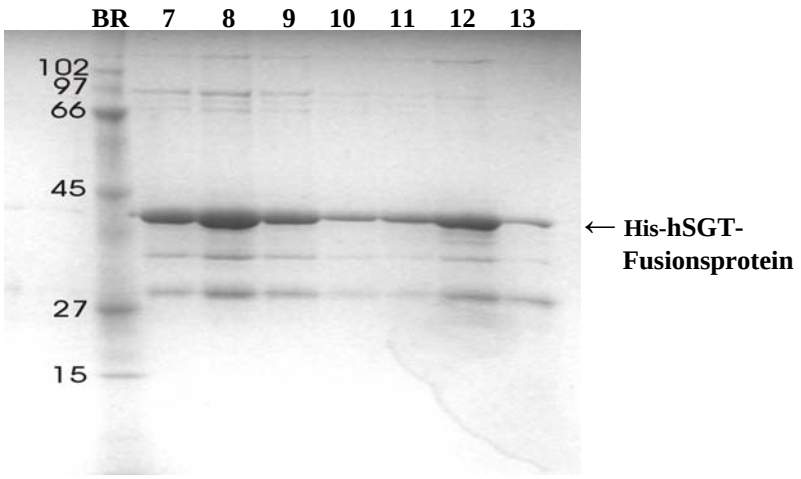


Abb. 4.17: SDS-PAGE der Fraktionen der Ausschlusschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex 200 (10/30)-Säule unter Hochsalzbedingungen
BR = broad range Marker, die Zahlen entsprechen den Fraktionen des Superdex 200 (10/30)-Gelfiltrationslaufes (siehe Abb. 4.16). In beiden Hauptpeaks finden sich neben dm His-hSGT-Fusionsprotein auch die beiden anderen Proteine (35 und 32 kDa groß) wieder.

4.2.1.5 Versuch zur Spaltung des His-hSGT-Fusionsproteins, durch das Enzym Faktor Xa, in His-Tag und hSGT

Zusätzlich zu dem His-markiertem Protein sollte auch noch der Versuch unternommen werden, hSGT ohne Tag zu kristallisieren. Ein 10x-His-Tag ist zwar im Vergleich zum hSGT-Protein mit seinen 313 Aminosäuren relativ klein, dennoch kann durch die Anwesenheit des Tags die Kristallisation des Fusionsproteins erschwert sein. Aus diesem Grund wurde versucht, von dem über Ni-NTA-Sepharose Säule vorgereinigtem Fusionsprotein mittels des Enzyms Faktor Xa, den His-Tag abzuspalten. Dazu wurde das Fusionsprotein zuallererst nach der Elution von der Ni-NTA-Sepharosesäule, über eine Column PD-10 umgepuffert (siehe Abschnitt 3.2.4.4).

Nach Angaben des Herstellers (Novagene, Darmstadt) spaltet 1 U Faktor Xa 95 % eines Kontrollproteins (50 µg) innerhalb von 16 h bei Raumtemperatur. Für die Versuche zur Spaltung des Fusionsproteins wurden zwei verschiedene Mengen an Enzym (1 bzw. 2 U Faktor Xa auf 100 µg hSGT-Protein), unterschiedliche Inkubationstemperaturen (4, 10, 20, 30 und 37 °C) und verschieden lange Inkubationszeiten (2, 4, 6, 8, 11 h) getestet. Mit Hilfe des Programms **Peptide Cutter** auf der ExPASy-Homepage wurde die Aminosäuresequenz des hSGT-Proteins auf mögliche Faktor Xa-Schnittstellen untersucht. Das benutzte Programm fand keine Schnittstellen.

Während des Versuchs stellte sich heraus, dass Faktor Xa das His-hSGT-Fusionsprotein nicht nur an der Faktor Xa-Schnittstelle zwischen His-Tag und Zielprotein spaltete, sondern auch in kürzester Zeit (im Vorversuch bereits nach nur 2 Stunden) innerhalb des hSGT-Proteins schnitt (siehe Abbildung 4.18).

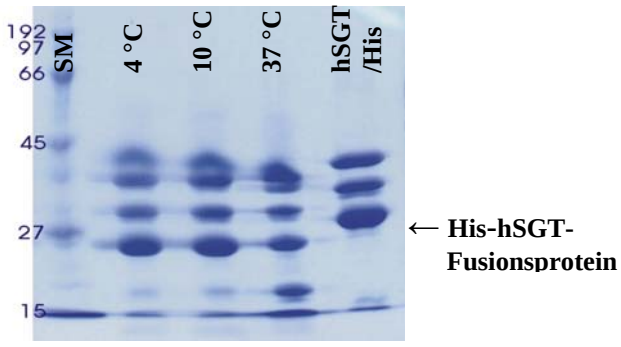


Abb. 4.18: Versuch zur Abspaltung des His-Tag vom His-hSGT-Fusionsprotein mittels Faktor Xa-Protease
In der ersten Spalte des 12,5 %igen SDS-Gels wurde SM-Marker aufgetragen. In die Spuren 2-4 wurde, über 8 Stunden mit Faktor Xa geschnittenes, hSGT-Protein (1U Enzym pro 50 µg Protein) aufgetragen. In Spalte 5 kann man, von der Ni-NTA-Sepharosesäule eluiertes, ungeschnittenes hSGT-Protein erkennen.

4.2.1.6 Kontrolle des hSGT-His-Tag-Fusionsproteins im Eluat der Ni-NTA-Sepharosesäule mittels Western-Blot

In Abbildung 4.17 kann man unterhalb der erwarteten hSGT-His-Tag-Fusionsproteinbande, noch zwei weitere Banden (ca. 32 und 35 kDa groß) erkennen. Um einen Hinweis zur Identität dieser zwei Proteinbanden zu erhalten, wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.1.5.3). Mit dem Primärantikörper (anti-6His-mouse) konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, welche der von der Ni-NTA-Sepharosesäule eluierten Proteine einen His-Tag besaßen. Gleichzeitig wurde auch das von der Superdex 200 (26/60) eluierte hSGT-His-Tag-Fusionsprotein untersucht (siehe Abbildung 4.15).

Nach dem Western Blot sind auf der Membran zwei His-markierte Proteinbanden deutlich zu erkennen. Ihre Größen betragen 37 und 32 kDa. Zwischen diesen Proteinbanden ist noch eine weitere Bande sehr schwach auf der Membran zu erkennen. Die Größe dieses His-markierten Proteins beträgt ca. 35 kDa.

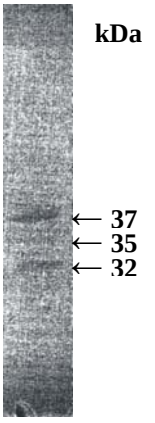


Abb. 4.19: PVDF-Membran nach Western-Blot zur Detektion His-markierter Proteine
Auf der PVDF-Membran sind nach dem Anfärben zwei Protein-Banden deutlich zu erkennen (37 und 32 kDa groß), die dazwischenliegende Bande (35 kDa groß) ist nur sehr schwach ausgeprägt.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass alle drei auf dem SDS-Gel sichtbaren Proteinbanden nach Affinitätschromatographie von His-hSGT-Fusionsprotein (siehe Abbildung 4.13), His-markierte Proteine enthalten.

4.2.2 Expression und Aufreinigung des hSGT-Proteins über den pGEX6P1+1-Expressionsvektor, mit anschließender Abspaltung des GST-Tag mittels PreScission Protease.

Der Vorteil des pGEX-6P1+1-Vektors liegt darin, dass das hSGT-Protein als N-terminales GST-Fusionsprotein exprimiert werden kann. Das GST-hSGT-

Fusionsprotein kann anschließend durch das Enzym PreScission Protease in GST und hSGT gespalten werden. Bei dieser Spaltung behält das hSGT-Protein nur wenige Aminosäuren am N-terminus übrig.

Um einen Hinweis zu bekommen, welcher *E. coli*-Stamm für die Expression des GST-hSGT-Fusionsproteins geeignet ist, wurde eine Analyse der Codon Usage vorgenommen. Die graphischen Auswertungen dieser Untersuchungen können im Anhang (siehe Anhang 8.2 und 8.3) nachgeschlagen werden.

Wie im Anhang 8.2 sehr deutlich zu sehen ist, können Probleme auftreten bei der unterschiedlichen Codon Usage von *Homo sapiens* und *E. coli*. Bei dem Protein hSGT (siehe Anhang 8.3) treten diese Probleme gehäuft bei der Aminosäure Arginin, und hier hauptsächlich bei den Codons AGA und AGG auf. Aus diesem Grund wurde nach einem Expressionsstamm gesucht, der für die meisten, in *E. coli* ungewöhnlichen tRNAs, extra Kopien jener Gene enthält. Im folgenden wurden die zwei Stämme BL21 (DE3) RIL und Rosetta (DE3), im Hinblick auf die Expression des GST-hSGT-Fusionsproteins, getestet.

4.2.2.1 Überexpression von GST-hSGT-Fusionsprotein in *E. coli* und Affinitätschromatographische Aufreinigung

Zur Etablierung einer geeigneten Expressions- und Aufreinigungsstrategie wurde getestet, unter welchen Wachstumsbedingungen und in welchem Expressionsstamm GST-hSGT-Fusionsprotein in hoher Ausbeute hergestellt werden kann. Hierzu wurde das hSGT-pGEX6P1+1-Plasmid in die zwei zur Expression des Proteins geeigneten *E. coli*-Stämme, BL21 (DE3) RIL und Rosetta (DE3), transformiert. Die Expression wurde dann für jeden einzelnen Bakterienstamm unter verschiedenen Bedingungen getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass der Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) nicht in der Lage war, das GST-hSGT-Fusionsprotein in größeren Mengen löslich zu exprimieren (siehe Abbildung 4.20).

Man sieht deutlich die starke Proteinbande nach Auftragung einer Probe vom Zellpellet nach dem Zellaufschluss. Im Überstand dagegen ist nur eine schwache Proteinbande auf gleicher Höhe zu erkennen.

Der erste Reinigungsschritt bei der Aufreinigung des GST-hSGT-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe der Glutathion-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 3.2.4.1.2). Der Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde auf die Glutathion Sepharosesäule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule dreimal im „batch“-Verfahren

gewaschen und das GST-hSGT-Fusionsprotein mit Elutionspuffer von der Säulenmatrix eluiert. 1 ml große Fraktionen wurden aufgefangen und im Bradford-Schnelltest qualitativ auf ihren Proteingehalt getestet.

Die Säule wurde solange mit Elutionspuffer gespült, bis im Bradford-Test keine Proteine mehr detektiert werden konnten. Das Eluat von der Glutathion Sepharosesäule wurde mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 4.20).

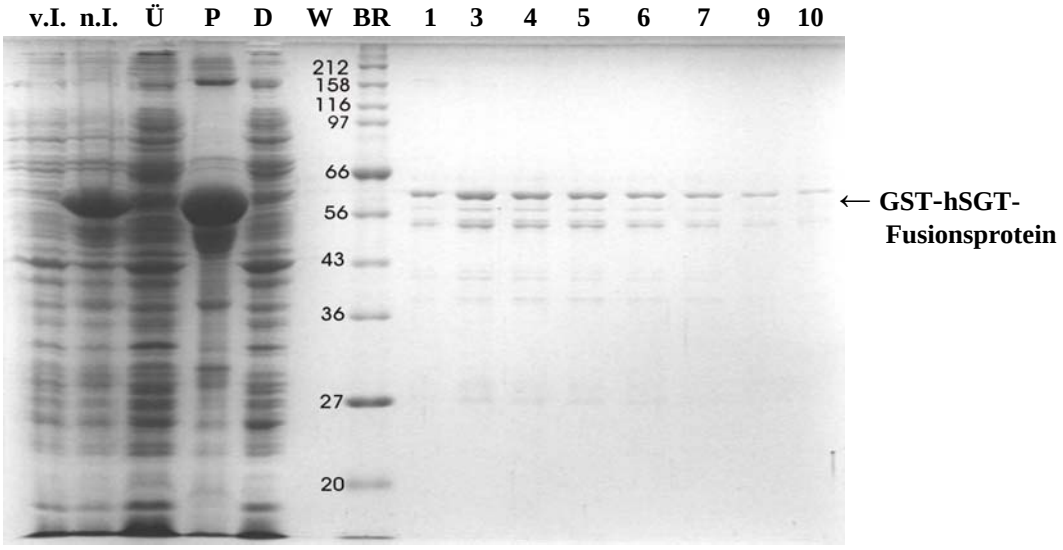


Abb. 4.20: Expressionsniveaus von GST-hSGT-Fusionsprotein in Rosetta(DE3)
Rosetta(DE3) *E. coli*-Zellen mit pGEX6P1+1/hSGT-Plasmid wurden bei 37 °C in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen. Dann wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 4 Std. bei 20°C inkubiert.
Vor und nach der Induktion wurde eine Proben abgenommen, die OD_{600} bestimmt, gleiche Mengen an Zellen wurden in Laemmli aufgenommen und 5 Min. aufgekocht. Das Zelllysat wurde in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. V.I. = vor Induktion, n.I. = nach Induktion (zum Zeitpunkt der Ernte), BR = Broad Range Marker, Ü = Überstand, P = Pellet, D = Durchfluss der Glutathion Sepharosesäule während des Proteinauftrags, W = Durchfluss durch die Säule nach 3maligem Waschen.

Obwohl der größte Teil des Fusionsproteins unlöslich war, ließ sich der lösliche Teil doch gut mit Hilfe der Glutathion-Affinitätschromatographie aufreinigen. Wie schon beim His-hSGT-Fusionsprotein zeigen sich auch beim GST-hSGT-Fusionsprotein drei Banden auf dem Gel (vgl Abbildung 4.7 und 4.20). Das GST-hSGT-Fusionsprotein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 62 kDa (35 kDa = hSGT-Protein ohne Tag + 27 kDa GST-Tag). Die beiden unterhalb der Fusionsproteinbande zu findenden Proteine besitzen Molekulargewichte von etwa 58 und 54 kDa.

Aufgrund der Schwierigkeit von Rosetta (DE3)-Zellen, das Fusionsprotein in ausreichenden Mengen löslich zu produzieren wurde von weiteren Versuchen mit diesem Expressionsstamm abgesehen. Die Ausbeute an GST-hSGT-Fusionsprotein betrug nach

der Affinitätschromatographie und der Expression in Rosetta (DE3)-Zellen nur 1,6 mg Protein pro Liter Expressionskultur.

Zeitgleich zur Expression des GST-hSGT-Fusionsprotein in Rosetta (DE3) wurde auch eine Expression des Fusionsproteins in *E. coli* BL21 (DE3) RIL durchgeführt. Die Expressionsbedingungen waren identisch. Nach dem Zellaufschluss zeigte sich, dass das Fusionsprotein aus *E. coli* BL21 (DE3) RIL-Zellen in löslicher Form gewonnen werden konnte.

In Abbildung 4.21 kann man deutlich erkennen, dass nur ein geringer Teil des Gesamtfusionsproteins im Pellet nach dem Zellaufschluss zu finden ist. Der überwiegende Teil des GST-hSGT-Fusionsproteins befindet sich in löslicher Form im Überstand. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte identisch wie aus Rosetta (DE3)-Zellen.

Das Eluat von der Glutathion Sepharosesäule wurde mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung. 4.21).

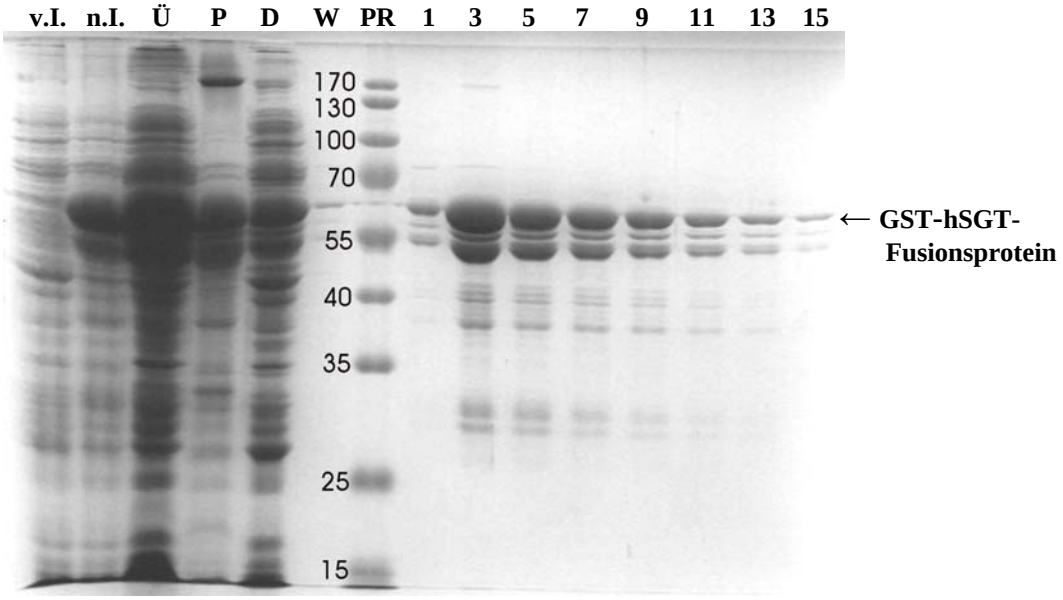


Abb. 4.21: Expressionsniveaus von GST-hSGT-Fusionsprotein in BL21(DE3)RIL

BL21(DE3)RIL *E. coli*-Zellen mit pGEX6P1+1/hSGT-Plasmid wurden bei 37 °C in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen. Dann wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 4 Std. bei 20°C inkubiert.
Vor und nach der Induktion wurde eine Proben abgenommen, die OD_{600} bestimmt, gleiche Mengen an Zellen wurden in Laemmli aufgenommen und 5 Min. aufgekocht. Das Zelllysat wurde in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. V.I. = vor Induktion, n.I. = nach Induktion (zum Zeitpunkt der Ernte), PR = PaigeRuler prestained Protein Ladder, Ü = Überstand, P = Pellet, D = Durchfluss der Glutathion Sepharosesäule während des Proteinauftrags, W = Durchfluss durch die Säule nach 3maligem Waschen.

Wie schon beim His-hSGT-Fusionsprotein und auch beim GST-hSGT-Fusionsprotein aus Rosetta (DE3)-Zellen findet sich auf dem 12,5 %igen SDS-Gel drei starke Proteinbanden: das GST-hSGT-Fusionsprotein mit einem theoretischen Molekulargewicht von

62 kDa und die beiden darunter liegenden Banden mit Molekulargewichten von etwa 58 und 54 kDa. Die Ausbeute an GST-hSGT-Fusionsprotein betrug nach der Affinitätschromatographie und der Expression in BL21 (DE3) RIL-Zellen 26 mg Protein pro Liter Expressionskultur.

4.2.2.2 Ausschlusschromatographische Aufreinigung des hSGT-Proteins

Für die präparative, ausschlusschromatographische Aufreinigung des GST-hSGT-Fusionsproteins aus der Affinitätschromatographie wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.1.3 beschrieben, verfahren. Für diesen Reinigungsschritt wurde eine Superdex-200-Säule (HiResolution™ 10/30) verwendet. Von dem GST-hSGT-Fusionsprotein wurde nach der Ankonzentrierung auf 10 mg/ml (siehe Abschnitt 4.2.1.2) 60 µl auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe Abbildung 4.22). Die blaue Kurve entspricht der UV Absorption bei 280 nm und die rote der UV-Absorption bei 260 nm. Die braune Kurve stellt die Leitfähigkeit dar. Die Höhe der UV-Absorption bei 260 nm beträgt im Maximum des höchsten Peaks etwa 50 mAU. Im Vergleich hierzu ist die UV Absorption bei 280 nm im selben Peak mit 100 mAU im Maximum etwa doppelt so hoch. Dieses Verhältnis ist typisch für Proteine.

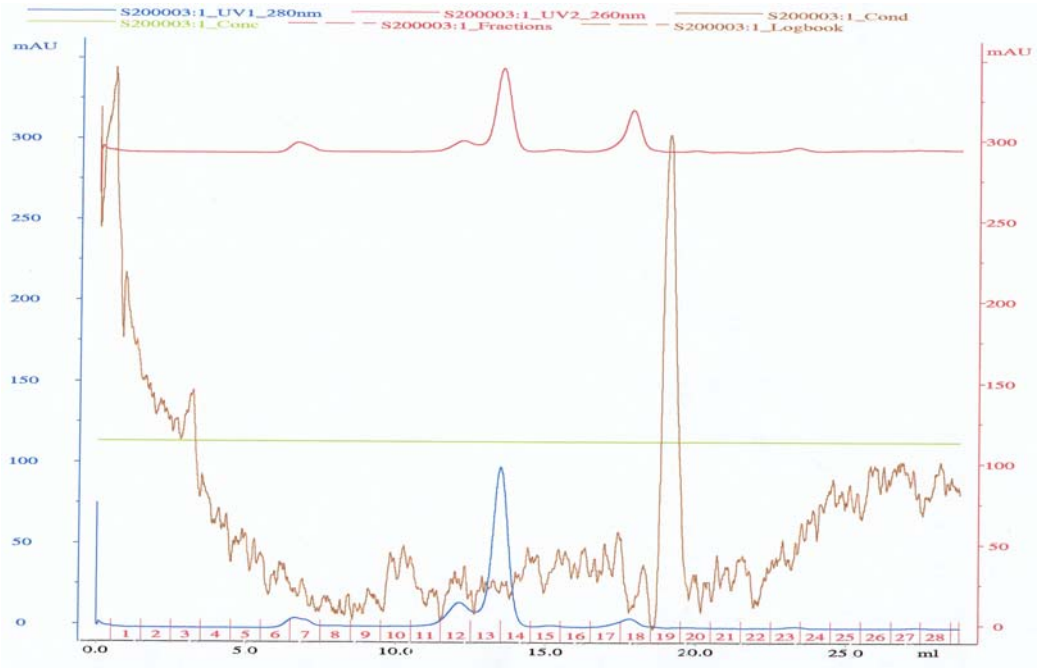


Abb. 4.22: Elutionsprofil einer Gelfiltration von GST-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex-200 (10/30)-Säule
In diesem Versuch wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 12-14 enthalten das GST-hSGT-Fusionsprotein (siehe Abb. 4.21). Die Proteine in den beiden Hauptpeaks unterscheiden sich hinsichtlich ihres Oligomerisierungsgrades (1. Peak = Dimer, 2. Peak = Monomer). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 280 nm. Braun: Leitfähigkeit.

Das Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes zeigt zwei Hauptpeaks (Fraktionen 12-14). Nach der Analyse der Fraktionen in einem 12,5 %igen SDS-Gel kann man erkennen, dass in beiden Peaks das GST-hSGT-Fusionsprotein eluiert (siehe Abbildung 4.23).
Die, mit Hilfe der Kalibrierung in Anhang 8.4, berechnete Größe der Proteine aus dem ersten Peak (Elution nach 11,5 ml) entspricht dimerisiertem Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 130 kDa. Die berechnete Größe der Proteine aus dem zweiten Peak (Elution nach 13 ml) entsprechen monomerem GST-hSGT-Fusionsprotein mit einer Größe von ca. 60 kDa. Auch wenn monomeres SGT-Protein von dieser Säule eluiert werden kann, besteht es dennoch aus einer Mischung verschiedengroßer Proteine. Der Größenunterschied der verschiedenen SGT-Proteine ist so gering, dass sie über eine S200-Gelfiltrationssäule nicht getrennt werden können.

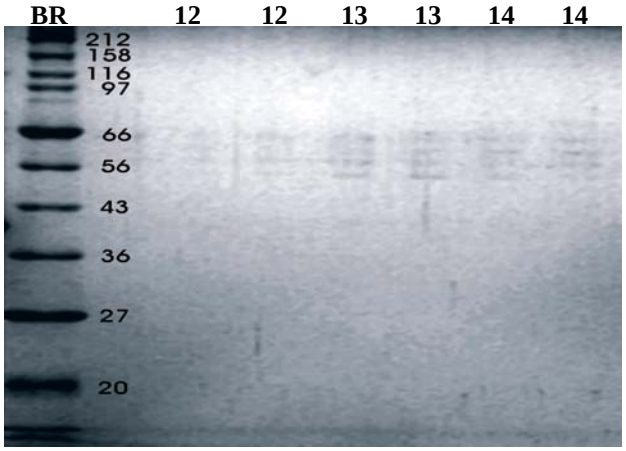


Abb. 4.23: SDS-PAGE der Fraktionen der Ausschlusschromatographie von GST-hSGT-Fusionsprotein über eine Superdex 200 (10/30)-Säule
BR = broad range Marker, die Zahlen entsprechen den Fraktionen des Superdex 200 (10/30)-Gelfiltrationslaufes (siehe Abb. 4.16). Alle relevanten Fraktionen wurden 2 mal auf das 12,5 %ige SDS-Gel aufgetragen. In beiden Hauptpeaks finden sich neben dm GST-hSGT-Fusionsprotein auch zwei weitere kleinere Proteine.

4.2.2.3 Proteolytische Spaltung des GST-hSGT-Fusionsproteins durch PreScission Protease in hSGT und GST-Tag

Innerhalb des GST-hSGT-Fusionsproteins liegt eine PreScission Protease-Schnittstelle, welche hSGT und GST voneinander trennt. Ist diese Aminosäuresequenz für das Enzym zugänglich, wird sie spezifisch durch die PreScission Protease erkannt und geschnitten. Die proteolytische Spaltung wurde wie in Abschnitt 3.2.4.4 (Methode 1, Spaltung direkt auf dem Säulenmaterial) beschrieben durchgeführt. Um hSGT-Protein ohne Tag zu erhalten wurde das GST-hSGT-Fusionsprotein mit der PreScission Protease gespalten.

Anschließend wurde die Proteolytische Spaltung in einem 12,5 %igen SDS-Gel überprüft (siehe Abbildung 4.24).

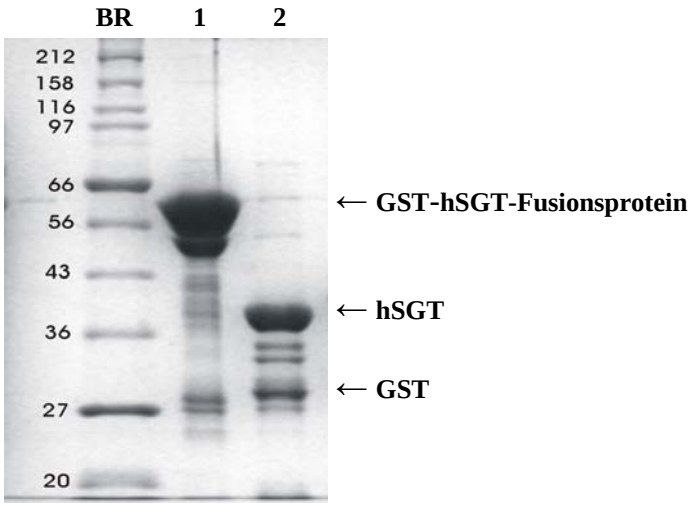


Abb. 4.24: PreScission Protease-Spaltung des GST-hSGT-Fusionsproteins
Das 12,5 %ige SDS-Gel zeigt die Spaltung des GST-hSGT-Fusionsproteins mit der Protease PreScission. BR = Broad Range Marker. Spur 1 wurde mit rekombinantem Protein vor der Spaltung beladen, es fungierte in diesem Versuch als Krontrolle zur proteolytischen Spaltung. In Spur 2 wurde mit PreScission Protease geschnittenes Fusionsprotein aufgetragen. Das GST-hSGT-Fusionsprotein, das hSGT-Protein und die Glutathion S-Transferase (GST) sind jeweils mit Pfeilen markiert.

Zur Kontrolle der Spaltung wurde ungespaltenes GST-hSGT-Fusionsprotein gemeinsam mit den Spaltprodukten hSGT und GST elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine konnten aufgrund ihrer spezifischen Molekulargewichte eindeutig identifiziert werden.

4.2.2.4 Ausschlusschromatographische Aufreinigung des hSGT-Proteins nach vorherigem PreScission Protease-Verdau

Für die präparative, ausschlusschromatographische Aufreinigung des hSGT-Proteins nach der proteolytischen Spaltung des GST-hSGT-Fusionsproteins durch PreScission Protease wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.1.3 beschrieben, verfahren.

Für diesen Reinigungsschritt wurde eine Superdex-200-Säule (HiResolution™ 10/30) verwendet. Von dem hSGT-Protein wurde nach der Ankonzentrierung auf 17 mg/ml (siehe Abschnitt 4.2.1.2) 200 µl auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe Abbildung 4.25). Die blaue Kurve entspricht der UV Absorption bei 280 nm und die rote der UV-Absorption bei 260 nm. Die braune Kurve stellt die Leitfähigkeit dar. Das Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes zeigt einen großen Hauptpeak mit einem Maximum der UV Absorption bei 280 nm von 250 mAU, und einen deutlich kleineren Peak direkt daneben.

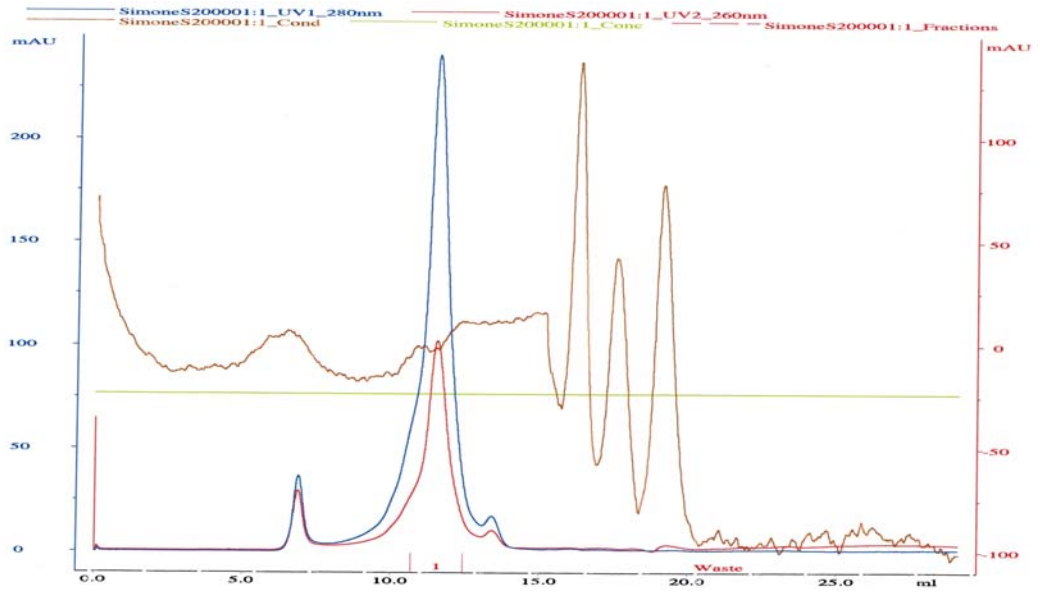


Abb. 4.25: Elutionsprofil einer Gelfiltration von hSGT-Protein über eine Superdex-200 (10/30)-Säule
In diesem Versuch wurde nur die Proteine des großen Hauptpeaks in einer Fraktion aufgefangen. Proteine in diesem Peak eluieren nach ca. 11,2 ml, dies entspricht oligomerisiertem hSGT-Protein. Die Proteine im folgenden Peak (Elution nach 12,8ml) sind deutlich kleiner mit einer berechneten Größe von etwa 70 kDa. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 280 nm. Braun: Leitfähigkeit.

Nach der Analyse der Fraktion 1 in einem 12,5 %igen SDS-Gel kann man erkennen, dass hier hSGT-Protein eluiert (siehe Abbildung 4.26). Die, mit Hilfe der Kalibrierung in Anhang 8.4, berechnete Größe der Proteine aus dem ersten Peak (Elution nach 11,2 ml) entspricht in etwa 150 kDa.

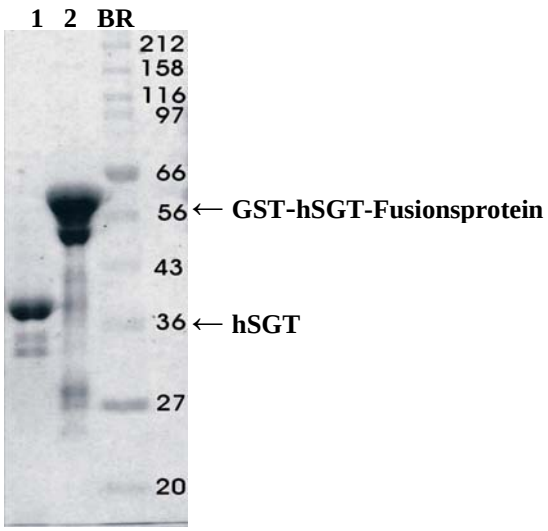


Abb. 4.26: SDS-PAGE der Fraktion Nr.1 der Ausschlusschromatographie von hSGT-Protein über eine Superdex 200 (10/30)-Säule
BR = broad range Marker. In Spur 1 ist die Fraktion Nr. 1 von der Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe Abbildung 4.25), in Spur 2 ist zum Vergleich noch einmal ungeschnittenes GST-hSGT-Fusionsprotein aufgetragen. In beiden Spuren finden sich neben dem hSGT-Protein bzw. GST-hSGT-Fusionsprotein zwei darunterliegende Banden.

SGT-Proteine konnten demnach als Tetramere eluiert werden. Es ist schwierig eine Aussage zum Oligomerisierungsgrad der Proteine in Peak 1 zu machen, da es sich noch immer um eine Mischung verschieden großer SGT-Proteine handelt. Die berechnete Größe der Proteine aus dem zweiten Peak (Elution nach 12,8 ml) entsprechen dimerisiertem hSGT-Protein mit einer Größe von ca. 70 kDa. Ein hSGT-Protein ist nach Abspaltung des GST-Tags etwa 36 kDa groß. Im Gegensatz zum GST-hSGT-Fusionsprotein scheint das hSGT-Protein ohne Tag die Fähigkeit zu besitzen Dimere bzw. Oligomere (Tetramere) bilden zu können Die Fähigkeit zur Oligomerisierung besaß auch das His-hSGT-Fusionsprotein. Monomeres SGT-Protein konnte nur als GST-hSGT-Fusionsprotein über eine ausschlusschromatographische Aufreinigung gewonnen werden. Die Fraktion mit dem hSGT-Protein wurde auf 16 mg/ml ankonzentriert. Es konnte somit für Kristallisationsversuche verwendet werden (siehe Abschnitt 4.3).

4.3 Kristallisation des hSGT-Proteins und des His-hSGT-Fusionsproteins

Bei der Röntgenstrukturaufklärung von Proteinen erweist sich die Kristallisation häufig als limitierender Schritt. Die Kristallisation des hSGT-Proteins und des His-hSGT-Fusionsproteins wurde mit der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen durchgeführt. Proteinlösung und Kristallisationspuffer wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Um erste Erkenntnisse über mögliche Kristallisationsbedingungen zu erlangen, wurden folgende Eingangsbedingungen (engl. initial screens) nach dem Prinzip von „Spare Matrix“ Screens verwendet:

- Ammoniumsulfat Screen (ASS)
- Clear Strategy Screen (CSS)
- Crystal Screen 1 (CS1)
- Crystal Screen 2 (CS2)
- Crystal Screen Lite (CSL)
- Crystal Screen Cryo (CSC)
- Crystal Screen PEG/Ion (CSPI)
- Footprint Screens 1-3 (FP 1-3)
- Magic Screen (MS)
- Natrix Screen (NS)
- Structure Screen (STS)

4.3.1 Kristallisation des His-hSGT-Fusionsproteins

4.3.1.1 Kristallisation des oligomerisierten His-hSGT-Fusionsproteins

Das His-hSGT-Fusionsprotein war nach der Gelfiltrationssäule als letztem Reinigungsschritt auf eine Konzentration von 5 mg/ml ankonzentriert worden (siehe Abschnitt 4.2.1.2.3). Nach der Gelfiltration lag es in einem Puffer mit 0,1 M NaCl und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 vor. Die Kristallisationsansätze wurden bei 20°C pipettiert und inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.5.1), und die Bilder von den Kristallen wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen. Ihre Größe wurde durch ein Messraster im Binokular bestimmt.

Nach einem Tag war das hSGT-Protein in etwa 50% aller Bedingungen ausgefallen. Die Lösungen in den anderen dagegen blieb klar. In der Bedingung CS2 Nr. 43 waren kleine nadelförmige Kristalle gewachsen (siehe Abbildung 4.27). Bei der Auflistung der Bedingungen wird auf die Angabe des Puffers der SGT-Präparation (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl) verzichtet.

Abb. 4.27: Kleine nadelförmige Kristalle in der Bedingung CS2 Nr. 43
Aufnahme mit einer Digitalkamera mit vorgespanntem Polarisationsfilter. Über Nacht waren in dieser Bedingung kleine nadelförmige Kristalle gewachsen. Jede einzelne Nadel dieses Sterns hat eine Länge von ca. 20 µM und eine Breite von 1-2 µM.

Bedingung im Tropfen:

100 mM	Tris/HCl, pH 8,5
50 % (v/v)	MPD
200 mM	Ammonium-Phosphat
Proteinkonzentration im Tropfen:	8 mg/ml
Temperatur:	20° C

Da die Kristalle für eine Vermessung im Diffraktometer zu klein waren, und sie aufgrund ihrer geringen Größe auch nicht über SDS-PAGE analysiert werden konnten, wurde versucht, ihr Größenwachstum zu verbessern. Durch ein systematisches Raster von Bedingungen, die sich geringfügig in ihren Salz- und Präzipitanskonzentrationen unterschieden, wurde versucht eine Bedingung zu finden bei der sich die Kristalle vergrößern ließen. Auch die pH-Werte und die Pufferzusammensetzungen wurden verändert. Salze wurden durch andere Salze mit ähnlichen Ionenradien ersetzt.

Hierbei stellte sich heraus, dass die Kristalle nach geringfügigen Änderungen der Eingansbedingungen in CD2 Nr. 43 auf 30% MPD, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 und 0,2 M $(NH_4)_2HPO_4$ etwas verbessertes Größenwachstum zeigten (siehe Abbildung 4.28).

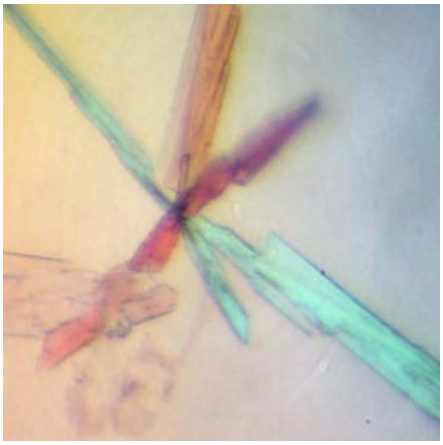


Abb. 4.28: Nadelförmige Kristalle in der angepassten Bedingung CS2 Nr. 43
Aufnahme mit einer Digitalkamera mit vorgespanntem Polarisationsfilter. Über Nacht waren in dieser Bedingung nadelförmige Kristalle gewachsen. Jede einzelne Nadel dieses Sterns hat eine Länge von ca. 60 µM und eine Breite von 5-7 µM.

Bedingung im Tropfen:

100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
30 % (v/v)	MPD
200 mM	Ammonium-Phosphat
Proteinkonzentration im Tropfen:	8 mg/ml
Temperatur:	20° C

Obwohl nadelförmige Kristalle für konventionelle Einkristallbeugungsmethoden eigentlich ungeeignet sind, wurde dennoch einer dieser Kristalle im Diffraktometer vermessen, streute den Röntgenstrahl jedoch nicht. Aus diesem Grund wurden zum Zwecke der weiteren Verbesserung der Kristalle die Additiv Screens 1-3 der Fa. Hampton Research und die Detergenzien Screens 1-3 der Fa. Hampton Research als Zusatz in der oben genannten verbesserten Bedingung eingesetzt. Hierbei wird das Additiv oder Detergens 1:10 im Tropfen verdünnt. Durch den Zusatz von Mangan-Chlorid zur Kristallisationslösung (Additive Screen 1, Nr. 7) konnten zusätzliche Kristalle mit einer pyramidenförmigen 3D-Struktur gewonnen werden (siehe Abbildung 4.29).

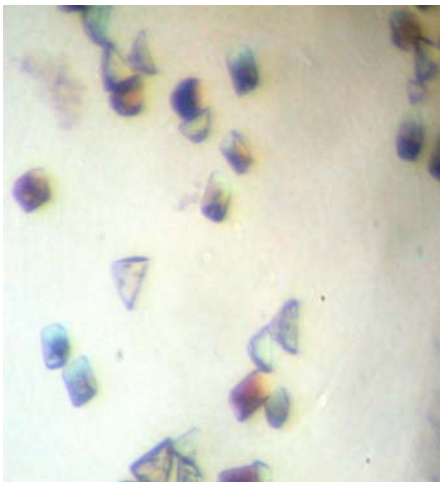


Abb. 4.29: Kleine pyramidenförmige Kristalle in der angepassten Bedingung CS2 Nr. 43 nach Zugabe des Additivs Mangan-Chlorid
Aufnahme mit einer Digitalkamera mit vorgespanntem Polarisationsfilter. Über Nacht waren in dieser Bedingung kleine pyramidenförmige Kristalle gewachsen. Jede Seitenkante eines Kristalls hat eine Länge von 4 µM und eine Höhe von 3 µM.

Bedingung im Tropfen:

100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
30 % (v/v)	MPD
200 mM	Ammonium-Phosphat
10 mM	Mangan-Chlorid
Proteinkonzentration im Tropfen:	8 mg/ml
Temperatur:	20° C

Doch trotz aller Bemühungen waren diese Kristalle für eine Vermessung im Diffraktometer immer noch zu klein. Aus diesem Grund wurde eine Kombination aus „Micro- und Macro-Seeding“ eingesetzt um das Kristallgrößenwachstum zu verbessern. Zuerst wurde mit 2-3 kleinen pyramidenförmigen Kristallen aus der angepassten Bedingung CS2 Nr.43 nach Zugabe des Additivs Mangan-Chlorid „Micro-Seeding“ durchgeführt. Bereits am nächsten Tag wurden die neu gewachsenen Kristalle aus diesen Bedingungen im Zuge des „Macro-Seedings“ weiterverarbeitet (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Die Länge der Kristalle konnte durch diese Techniken auf 10 µm erhöht werden, ihre Höhe auf 8 µm (siehe Abbildung 4.30). Anschließend wurden die Kristalle im Diffraktometer vermessen. Dies brachte jedoch keine Ergebnisse, da keine Reflexe auf dem Detektor erkennbar waren.

Die, durch das schnelle Wachstum der Kristalle begründete unregelmäßige Struktur der Kristalle sollte durch verlangsamtes Wachstum verbessert werden. Hierzu wurde das Reservoir mit Al’s Oil überschichtet. Al’s Oil ist eine 1:1 Mischung aus Silicon und Paraffin Öl (D’Arcy *et al*. 1996).

Bei erneuten Messungen im Diffraktometer und nach einer optischen Auswertung der vohandenen Reflexe auf dem Detektor stellten sich die Kristalle als Salzkristalle heraus.

Abb. 4.30: Pyramidenförmige Kristalle nach Zugabe des Additivs Mangan-Chlorid und einer Kombination aus Macro- und Micro-Seeding
Aufnahme mit einer Digitalkamera mit vorgespanntem Polarisationsfilter. Über Nacht waren in dieser Bedingung pyramidenförmige Kristalle gewachsen. Jede Seitenkante eines Kristalls hat eine Länge von 10 µM und eine Höhe von 8 µM.

Bedingung im Tropfen:

100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
30 % (v/v)	MPD
200 mM	Ammonium-Phosphat
10 mM	Mangan-Chlorid
Proteinkonzentration im Tropfen:	8 mg/ml
Temperatur:	20° C

Die nadelförmigen Kristalle in den untersuchten Bedingungen (siehe Abbildungen 4.27 und 4.28) konnten weder durch „Micro-Seeding“ noch durch „Macro-Seeding“ und auch nicht durch eine Kombination der beiden Methoden verbessert werden. Eine genauere Aussage über diese nadelförmigen Kristalle kann nicht getroffen werden, da sie weder den Röntgenstrahl im Diffraktometer streuen, noch sich (aufgrund ihrer geringen Größe) auf einem SDS-Gel analysieren lassen.

4.3.1.2 Kristallisation des dimerisierten His-hSGT-Fusionsproteins

Das dimerisierte hSGT-Protein war nach der Gelfiltration auf eine Konzentration von 16 mg/ml ankonzentriert worden (siehe Abschnitt 4.2.1.3.2). Nach der Gelfiltration lag es in einem Puffer mit 0,1 M NaCl und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 vor. Die Kristallisationsansätze wurden bei 20°C und bei 10°C pipettiert und inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.5.1). Nach einem Tag fand sich in etwa 30% aller Bedingungen dunkelbraunes, denaturiertes Präzipitat. Die Lösungen in den anderen Wells blieben klar. Bis zum heutigen Tag war in keiner Bedingung eine Kristallbildung zu erkennen.
Entweder war das Protein in den Wells vollständig zu einem amorphen Präzipitat ausgefallen oder die Lösungen in den Wells blieben völlig klar. Es wurden keine nicht-amorphen Proteinaggregationen oder andere Strukturen, die zur Kristallbildung führen können, gefunden.

4.3.2 Kristallisation des hSGT-Proteins

Affinitäts-Markierungen an Proteinen haben den Nachteil, dass sie mit dem Protein interagieren können. Zudem können sie bei der Kristallisation stören. Aus diesem Grund sollte nicht nur His-hSGT-Fusionsprotein sondern auch hSGT-Protein ohne Markierung kristallisiert werden.
Das hSGT-Protein war nach der Gelfiltrationssäule als letztem Reinigungsschritt auf eine Konzentration von 16 mg/ml ankonzentriert worden (siehe Abschnitt 4.2.2.4).
Nach der Gelfiltration lag es in einem Puffer mit 0,1 M NaCl und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 vor. Die Kristallisationsansätze wurden bei 20°C pipettiert und inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.5.1).
Wie schon bei der Kristallisation des Fusionsproteins konnte auch in diesem Fall eine Präzipitation des Proteins nach nur einem Tag in etwa 30 % der untersuchten Bedingungen festgestellt werden. Auch bei dieser Kristallisation des hSGT-Proteins ohne Tag wurden bis zur Fertigstellung dieser Arbeit keine nicht-amorphen, klaren Proteinaggregationen oder andere Strukturen, die zur Kristallbildung führen können, gefunden.
In vielen Bedingungen konnte eine Phasenseparation beobachtet werden. Bei diesem Phänomen kann das Protein innerhalb der „Öl-Tröpfchen“ sehr stark konzentriert sein und oft erscheinen nach einiger Zeit Kristalle in diesen Bedingungen. Aber auch Phasenseparation führte schlussendlich zu keiner Kristallbildung in den untersuchten Bedingungen.

5 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit zielte auf die Aufklärung der drei-dimensionelen Struktur des humanen small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing (SGT)-Proteins ab. Das Interesse an der drei-dimensionalen-Struktur liegt darin begründet, dass man hofft man auf diese Weise zur Aufklärung der Funktion des SGT-Proteins beitragen zu können. Denn bisher ist nur sehr wenig über die Bedeutung und Funktion des SGT-Proteins bekannt.

Um dieses vorgegebene Ziel zu erreichen, musste zuerst eine Expressions- und Aufreinigungsstrategie für das humane SGT-Protein etabliert werden, welche es ermöglicht, das hSGT-Protein in ausreichender Menge und Reinheit für die Kristallisationsversuche herzustellen. Im Hinblick auf die abschließenden Kristallisationsversuche wurden zwei Expressionstrategien verfolgt. Zum einen wurde mit His-markiertes hSGT-Protein aufgereinigt und zur Kristallisation verwendet und zum anderen wurde hSGT-Protein ohne tag hergestellt und in Kristallisationsversuchen eingesetzt.

Nach der Aufreinigung beider Proteinvariationen (als Fusionsprotein und als reines Protein) wurden sogenannte „initial screens“ verwendet, um erste Erkenntnisse über mögliche Kristallisationbedingungen zu erfahren. In einer dieser „initial screen“-Bedingungen konnten Kristalle beobachtet werden, deren Wachstum anschließend durch diverse Techniken verbessert werden konnte (siehe Abschnitt 5.4). Obgleich es nicht gelang, dass humane SGT-Protein in einer Form zu kristallisieren die es ermöglicht hätte, mittels röntgendiffraktometrischer Untersuchungen, die drei-dimensionale Struktur des Proteins aufzuklären, konnten dennoch im Rahmen dieser Arbeit erste Bedingungen gefunden werden, bei denen eine Kristallbildung des humanen SGT-Proteins beobachtet werden konnte.

5.1 Klonierung der hSGT-Gensequenz in den Expressionsvektor pGEX6P1+1

Nachdem sich eine Spaltung des His-hSGT-Fusionsproteins in hSGT-Protein und His-tag als nicht durchführbar erwies (siehe Abschnitt 4.2.1.5), wurde die Gensequenz für das hSGT-Protein mit dem Ziel der späteren Spaltung des neuen Fusionsproteins in den

Expressionsvektor pGEX6P1+1 umkloniert. Zur Erzeugung eines GST-hSGT-Fusionsproteins wurde die Gen-Sequenz für das humane SGT-Protein in den Expressionsvektor pGEX6P1+1 kloniert. Dazu wurde die Gen-Sequenz von SGT an ihrem N-Terminus im Leserahmen mit GST und einer Erkennungsregion für eine PreScission Protease zur enzymatischen Abspaltung des GST vom gewünschten Protein nach Expression kloniert. Hierzu wurde die hSGT-Gensequenz über die beiden Restriktionsenzyme *Nde*I und *Xho*I aus dem Vektor pET16b herausgeschnitten. Der ebenfalls mit den beiden Enzymen *Nde*I und *Xho*I geschnittene Vektor wurde nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase mit dem zuvor ausgeschnittenen Gen-Fragment ligiert. Zur Kontrolle von Nukteotidabfolge und Leserahmen wurden die pGEX6P1+1-hSGT-Klone nach Transformation in *E. coli* XL1 blue und Durchführung einer PCR mit vektor-spezifischen Primern (siehe Abschnitt 3.1.6) sequenziert. Die Sequenzierung wurde nach der didesoxy-Methode nach Sanger (1977) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Erst danach erfolgt eine Transformation in einen *E. coli*-Expressionsstamm.

Unter zu Hilfenahme des pGEX6P1+1 Vektors konnte somit ein Fusionsprotein mit N-terminalem GST-tag und C-terminalem hSGT-Protein mit einer dazwischenliegenden PreScission-Protease-Schnittstelle exprimiert werden. Das Fusionsprotein konnte noch während der Aufreinigung mittels des Enzyms PreScission-Protease in GST-tag und hSGT-Protein gespalten werden.

5.2 Expression und Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins

Für anschließende Kristallisationsversuche ist es essentiell, das zu kristallisierende rekombinante Protein sehr rein und in großen Mengen (mehrere Milligramm pro Milliliter) herzustellen. Zu diesem Zwecke wurde ein Expressions- und Aufreinigungprotokoll entwickelt, welches große Expressionsausbeuten mit einer zeitsparenden, wenige Schritte umfassenden Aufreinigungsstrategie kombiniert, um die Proteinverluste während der gesamten Aufreinigung gering zu halten.

Die Wahl fiel auf ein bakterielles Expressionssystem (*E. coli*). Diese werden sehr häufig verwendet, da sie vergleichsweise kostengünstig sind, und auch der benötigte Zeitaufwand gering ist im Vergleich mit anderen Expressionssystemen. Zudem ist die Ausbeute an rekombinantem Protein recht hoch.

In der Biochemie wird häufig die Methode der Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC = immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie) eingesetzt, bei der eine schnelle Isolierung des rekombinanten Proteins durch Einführung einer Polyhistidin-Markierung (His-tag) erfolgen kann. Der Vorteil einer recht kleinen Markierung, wie dem His-tag, liegt darin, dass er aufgrund seiner geringen Größe weniger mit dem Fusionsprotein interagiert als es z.B. eine große Markierung tun würde. Aus diesem Grund muß er auch für die Kristallisationsversuche nicht unbedingt abgespalten werden. Für diesen Expressionsansatz wurde der pET16b-Expressionsvektor verwendet. Der für hSGT kodierende Genabschnitt (Accession: NM_003021) war bereits über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I in den Vektor pET16b kloniert worden, und wurde mir freundlicherweise für die Diplomarbeit von Herrn R. Ficner (Molekulare Strukturbiologie, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Die unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors stehende Expression des His-hSGT-Fusionsproteins erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. Durch eine Erniedrigung, sowohl der IPTG-Konzentration von 1 mM auf 0,5 mM als auch der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 20 °C, konnte die Menge an löslich exprimierem Protein signifikant gesteigert werden.

Die Aufreinigung erfolgte problemlos über eine HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säule mit einer anschließenden Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Superdex-S200-Gelfiltrationssäule (HiLoad™ 26/60). Aber bereits nach der IMAC zeigte sich bei einer Kontrolle der Elutionsfraktionen auf einem SDS-Gel, dass sich das His-hSGT-Fusionsprotein über 1D-Gelelektrophorese in drei Fraktionen auftrennen ließ. Durch einen Western Blot und die Verwendung eines anti-6His-mouse Primärantikörpers konnte gezeigt werden, dass alle drei auf dem Gel zu sehenden Proteinbanden eine His-Markierung besitzen (siehe Abbildung 4.19). Folglich muß der N-Terminus des Fusionsproteins in allen drei Proteinfraktionen noch intakt sein.

In Versuchen konnte gezeigt werden, dass das His-hSGT-Fusionsprotein auch nach 4 Wochen Lagerung bei 4 °C in dem für die Kristallisationversuche verwendeten Gelfiltrationpuffer stabil war (Daten nicht gezeigt). Eine Möglichkeit zur Erklärung des Vorhandenseins der zwei zusätzlichen His-markierten Proteine ist der schrittweise Abbau des C-Terminus des Fusionsproteins durch Proteasen bereits in der *E. coli*-Zelle. Um diesem möglichen Effekt entgegenzuwirken sollte bei zukünftigen Versuchen, das hSGT-Protein für Kristallisationsversuche zu exprimieren, der C-Terminus des Proteins

zusätzlich zum N-Terminus durch einen Affinitäts-tag geschützt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass sich beide tags gut abspalten lassen.

Des weiteren könnten die beiden zusätzlichen mit einem His-tag markierten Proteine auch in einem anfänglichen Zerfall bzw. Abbau der mRNA für das SGT-Protein in den *E. coli*-Zellen begründet sein. Der Zerfall bzw. der Abbau von mRNA spielt eine wichtige Rolle bei der prokaryotischen Genexpression. Die Stabilität einer mRNA in Prokaryoten resultiert aus ihrer Anfälligkeit für zelluläre Endoribonukleasen und 3'-Exoribonukleasen. Diese Anfälligkeit für enzymatischen Abbau liegt in Unterschieden der RNA-Sequenz und der RNA-Struktur begründet (Belasco *et al*., 1988). Es wurde gezeigt, dass die beiden in Bakterien am häufigsten vorhandenen Exoribonukleasen, die RNase II und die Polynucleotid-Phosphorylase (PNPase), am Abbau der mRNA beteiligt sind, indem sie die mRNA sehr schnell vom 3'-Ende her abbauen (Donovan *et al*., 1986). Unterschiede in der mRNA-Stabilität können auch zur unterschiedlichen Expression von Genen beitragen. An dem endonukleolytischen Abbau der mRNA sind die Endoribonukleasen RNAse III und RNAse E beteiligt, wobei die RNAse III sehr spezifisch doppelsträngige RNA schneidet. (Babitzke *et al*., 1993). Der Abbau von mRNAs kann durch die Ausbildung sekundärer Strukturen am 3'-Ende der mRNAs deutlich verlangsamt werden. Die Firma Invitrogen entwickelte einen *E. coli*-Stamm, der eine andere Lösung zur Verringerung des mRNA-Abbaus vorschlägt. Sie fügten dem *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm eine Mutation in dem Gen rne131 zu. Dieses Gen kodiert für die RNase E. Durch die Verwendung dieses Expressionsstammes könnte der mRNA-Abbau für das SGT-Protein möglicherweise vermindert werden. Die Vermutung, bei den beiden auf einem SDS-Gel zusätzlich zu sehenden Proteinbanden unterhalb der hSGT-Proteinbande, könnte es sich um eine Folge des mRNA-Abbaus innerhalb der *E. coli*-Zellen handeln, kristallisierte sich erst zum Ende dieser Arbeit heraus. Für Untersuchungen, die diese These stützen könnten blieb deshalb leider keine Zeit mehr. Für weitergehende Versuche zur Expression des humanen SGT-Proteins in Prokaryoten schlage ich deshalb die Verwendung des *E. coli* BL21 **Star** (DE3)-Stammes, der Fa. Novagene vor, der die besagte Mutation in dem rne131-Gen besitzt.

Das Problem der zwei zusätzlichen Proteinbanden auf einem SDS-Gel nach der Aufreinigung von SGT-Protein konnte auch in einigen Publikationen, wie dem zur Identifizierung des SGT-Proteins (Czieplucht *et al*., 1998) beobachtet werden. Es scheint ein generelles Problem zu sein, wenn SGT-Proteine in *E. coli*-Zellen exprimiert werden.

Jasiecki *et al*. (2003) untersuchten die Polyadenylierung von mRNA in Bakterien, denn Polyadenylierung von mRNA ist nicht nur ein eukaryotisches Phänomen. Sie fanden heraus, dass polyadenylierte mRNA in Bakterien effizienter abgebaut wird als nicht-modifizierte mRNA. Wobei die mRNA-Polyadenylierung in *E. coli* stärker messbar ist in langsam wachsenden Kulturen.

Ein Vergleich der drei Proteinbanden auf einem SDS-Gel nach der Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule, zeigt auch in den, während dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, einen Unterschied in der Ausprägung der zwei zusätzlichen Proteinbanden im Vergleich zum gewünschten Volllängen-Fusionsprotein, wenn die Expressionskulturen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurden. Bei den langsamer wachsenden Kulturen (Expression bei 20 °C, für etwa 12 Stunden, siehe Abbildung 4.13) waren die beiden zusätzlichen Proteinbanden auf einem SDS-Gel nach einer 1D-Gelelektrophorese signifikant stärker ausgeprägt als in den schneller wachsenden Expressionkulturen (Inkubation bei 37 °C für 4 Stunden, siehe Abbildung 4.7). Auch wenn sich die Expressionsausbeute durch ein verlangsamtes Wachstum deutlich steigern läßt, ist bei der Expression des SGT-Proteins aus den oben genannten Gründen von einer Erniedrigung der Inkubationstemperatur während der Expression abzuraten.

Alle Versuche zur Abtrennung der zwei zusätzlichen Proteine aus dem Gesamtproteingemisch schlugen fehl. Sie ließen sich weder durch Anionenaustauschchromatographie über eine ResourceQ- bzw. eine MonoQ-Säule abtrennen, noch durch hydrophobe Interaktionschromatographie über eine Phenylsepharose-Säule, noch duch verschiedene Gelfiltrationsmethoden. Bei den beiden Anionenaustausch-Chromatographie-Säulen (ResourceQ und MonoQ) reicht offensichtlich der Unterschied in der Gesamtladung der Proteine zwischen dem Volllängen-SGT-Protein und den beiden am C-Terminus verkürzten Fragmenten nicht aus für eine Trennung. Auch die Unterschiede in der Hydrophobizität von Volllängen-SGT-Protein und den beiden verkürzten SGT-Proteinen war nicht stark genug ausgeprägt für eine Trennung dieser Proteine über eine Phenylsepharose-Säule. Schlussendlich war es auf Grund der geringen Größenunterschiede der drei SGT-Proteine auch nicht möglich, das SGT-Proteingemisch über Größenausschluß-Chromatographie in die einzelnen Proteinfraktionen zu trennen.

Für die Kristallisationsversuche wurde somit ein Proteingemisch, welches aus Volllängen-His-hSGT-Fusionsprotein und zwei vom C-Terminus verkürzten Varianten desselben besteht, verwendet (siehe Abschnitt 5.4).

5.2.1 Oligomerisierungsverhalten des SGT-Proteins

Ein weiteres Problem bei der Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins ist die Homo- bzw. Hetero-Oligomerisierung des Selben. Wie auch schon beim mRNA-Abbau konnte auch im Hinblick auf eine Oligomerisierung des hSGT-Proteins eine Temperaturabhängigkeit in den durchgeführten Versuchen festgestellt werden. Während in den schnell wachsenden Kulturen fast ausschließlich oligomerisiertes (tetrameres) Fusionsprotein von der Gelfiltrationssäule eluiert werden konnte (siehe Abbildung 4.10), konnte nach einer Aufreinigung des His-hSGT-Fusionsproteins aus langsamer wachsenden Kulturen eine Mischung aus oligomerisiertem (tetramerem) und dimerisiertem Fusionsprotein gewonnen werden (siehe Abbildung 4.14). Durch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur während der Expression und einem damit einhergehenden verlangsamten Wachstum der *E. coli*-Kultur, wird zwar der mRNA-Abbau verstärkt, aber gleichzeitig kann ein verlangsamtes Wachstum der Zellen auch zu einer Dimerisierung des SGT-Proteins führen, welches für Kristallisationsversuche besser geeignet ist als oligomerisiertes (tetrameres) Protein.

In den Naturwissenschaften besteht Unklarheit darüber, in welchem Teil des SGT-Proteins die Fähigkeit zur Oligomerisierung verborgen liegt. Kordes et al. (1998) vermuten, dass die TPR-Domäne an der Oligomerisierung des SGT-Proteins beteiligt ist. Tobaben *et al*. (2003) dagegen konnten zeigen, dass eine am N-Terminus verkürzte Variante des SGT-Proteins seine Fähigkeit zur Oligomerisation verliert. Auch in den Versuchen zu dieser Arbeit zeigte sich, dass Veränderungen am N-Terminus z.B. durch Anheftung eines größeren tags Einfluß nehmen auf die Art der Oligomerisierung des SGT-Proteins. Wohingegen nach der Expression des His-hSGT-Proteins in schnell wachsenden Kulturen fast ausschließlich oligomerisiertes (tetrameres) Fusionsprotein aufgereinigt werden konnte (siehe Abbildung 4.10), gelang es nach der Expression von GST-hSGT-Fusionsprotein unter den selben Bedingungen neben einer geringen Menge an dimerisiertem Fusionsprotein, große Mengen an monomerem GST-hSGT-Fusionprotein aufzureinigen (siehe Abblidung 4.22). Aber nach der Entfernung des GST-tags konnte neben einer geringen Menge an dimerisiertem SGT-Protein fast

ausschließlich nur noch tetrameres SGT-Protein von der Gelfiltrationssäule eluiert werden. Aufgrund der enormen Größe des GST-tags und der damit wahrscheinlichen Interaktion mit dem SGT-Protein wurde von einer Kristallisation des GST-hSGT-Fusionsproteins Abstand genommen.

5.2.2 Oligomerisierungsverhalten des SGT-Proteins nach Hochsalzbehandlung

Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob sich die tetrameren His-hSGT-Fusionsproteine durch hohe Salzkonzentrationen (z. B. 1 M NaCl) in ihre Untereinheiten aufspalten lassen. Die Wirkung von Hochsalz kann zum einen durch den Ionenaustauscheffekt erklärt werden, wobei die Ionen des Salzes geladene Proteinreste verdrängen. Andererseits kann die steigende Ionenstärke auch die, zur Bindung notwenigen, elektrostatischen Wechselwirkungen schwächen. Im Falle des SGT-Proteins führte eine Hochsalzbehandlung allerdings zu einer Verstärkung des Oligomerisierungsgrades. Die hohe Salzkonzentration führte zu einem Wasserentzug durch die Erhöhung der Ionenstärke und damit zu einer Stabilisierung der hydrophoben Wechselwirkungen. Es folgte eine Aggregation der SGT-Proteine.

Proteine mit vielen hydrophoben Oberflächen aggregieren bei geringeren Salzkonzentrationen als Proteine mit wenigen hydrophoben Oberflächen. Diesen Effekt kann man sich z. B. auch beim Aussalzen von Proteinen zu Nutze machen.

SGT-Proteine scheinen ausgeprägte hydrophobe Oberflächenbereiche zu exponieren. Die Beziehung zwischen tetrameren SGT-Protein-Komplexen und der Salzkonzentration in einem „Standard-Gelfiltrationspuffer“ (0,1 M NaCl) sollte in weiteren Versuchen näher betrachtet werden. Eine Erniedrigung dieser Salzkonzentration könnte vielleicht die Ausbildung oligomerer Komplexe verringern.

Erste Untersuchungen des dimerisierten hSGT-Proteins mit Hilfe von UV-spektrometrischen Untersuchungen zeigten keinerlei Hinweise auf eine unspezifische Aggregation der beiden Proteine in dem Zweierkomplex, weder bei dem His-hSGT-Fusionsprotein noch bei dem hSGT-Protein ohne tag. Das oligomerisierte His-hSGT-Fusionsprotein nach Hochsalzbehandlung hingegen zeigte in den Untersuchungen deutliche Anzeichen einer unspezifischen Aggregation der Proteine (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu den tetrameren SGT-Komplexen waren nicht eindeutig. Dies könnte für eine teilweise unspezifische Aggregation

innerhalb des Viererkomplexes sprechen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass zwei SGT-Dimere, innerhalb derer die Proteine spezifisch miteinander interagieren, unspezifisch zu einem Tetramer über hydrophobe Wechselwirkungen aggregieren.

5.3 Expression und Aufreinigung des GST-hSGT-Fusionsproteins mit anschließender Spaltung in GST-tag und hSGT-Protein

Um einen Hinweis zu bekommen, welcher *E. coli*-Stamm für die Expression des GST-hSGT-Fusionsproteins geeignet ist, wurde eine Analyse der Codon Usage vorgenommen. Die graphischen Auswertungen dieser Untersuchungen können im Anhang (siehe Anhang 8.2 und 8.3) nachgeschlagen werden. Die Codon Usage beschreibt das Phänomen, dass Varianten des universellen genetischen Codes von verschiedenen Spezies unterschiedlich verwendet werden. Das heißt bestimmte Codons des degenerierten Codes werden bevorzugt benutzt, was letztlich der tRNA Konzentration innerhalb der Zelle entspricht. Die Codon Usage spielt eine große Rolle bei der Regulation der Proteinbiosynthese. Selten verwendete Codons können die Translation bremsen während häufig genutzte Codons die Translation beschleunigen können. Bei der gentechnischen Produktion eukaryotischer Proteine in Prokaryoten kann es daher von Vorteil sein, einen Expressionsstamm auszuwählen, welcher die Expression von Genen erlaubt, die für tRNAs für seltene Codons kodieren..

Für die Expression des GST-hSGT-Fusionsproteins wurden zwei unterschiedliche *E. coli*-Stämme getestet. Zum einen wurde mit der Stamm BL21 (DE3) RIL eine Expression durchgeführt. Dieser erlaubt die Expression von Genen, die tRNAs beinhalten für seltene Arginin-Codons, wie AGA und AGG, das Isoleucin-Codon AUA und das Leucin-Codon CUA. Zum anderen wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) getestet. Dieser erlaubt die Expression von Genen, die tRNAs beinhalten für seltene Arginin-Codons, wie AGA, AGG und CGA, das Glycin-Codon GGA, das Isoleucin-Codon AUA, das Leucin-Codon CUA und das seltene Prolin-Codon CCC.

Es stellte sich heraus, dass der Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) nicht in der Lage war, das GST-hSGT-Fusionsprotein in größeren Mengen löslich zu exprimieren (siehe Abbildung 4.20). Mit dem *E. coli*-Stämm BL21 (DE3) RIL hingegen ließen sich größere Mengen an löslich exprimiertem GST-hSGT-Fusionprotein herstellen.

Auch bei der Aufreinigung des GST-hSGT-Fusionsproteins konnte das Protein nach 1D-Gelelektrophorese auf einem SDS-Gel in drei Fraktionen aufgetrennt werden. Vermutlich handelt es sich auch in diesem Fall wieder um mRNA-Abbau (siehe Abschnitt 5.2).

Die Aufreinigung erfolgte zunächst über Affinitätschromatographie mittels einer Glutathion Sepharosesäule, während dessen bereits das Fusionsprotein durch die Verwendung des Enzyms PreScission Protease in GST-tag und hSGT-Protein gespalten werden konnte. Nach einem abschließenden Ausschlusschromatographie-Schritt über eine Gelfiltrationssäule (Superdex-200 (10/30)-Säule) konnte das tetramere hSGT-Protein ohne tag für Kristallisationsversuche verwendet werden (siehe Abschnitt 5.5).

Näheres zum Oligomerisierungsverhalten des GST-hSGT-Fusionsproteins kann im Abschnitt 5.2.1 nachgelesen werden.

5.4 Kristallisation des His-hSGT-Fusionsproteins

Ein Ziel dieser Diplomarbeit neben der Aufreinigung des SGT-Proteins, war die röntgendiffraktometrische Strukturaufklärung der drei-dimensionalen Struktur des small glulatime-rich tetratricopeptide repeat containing (SGT)-Proteins. Die Kenntnis der räumlichen Beschaffenheiteines Proteins, besonders die, der aktiven Zentren und Bindungsstellen, ist unverzichtbar für das ursächliche Verstehen der Funktionen des zu untersuchenden Proteins. Ein weiteres Verfahren, Informationen zur Funktion eines Proteins zu erhalten, ist das sogenannte „protein modelling“. Hierbei setzt man Sequenz und Struktur bereits aufgeklärter Proteine in Beziehung zueinander (ein sogenannter Homologievergleich). Für die Vorhersage bei nahe verwandten Proteinen, z.B. aus derselben Proteinfamilie, funktioniert das recht gut. Bisher gibt es keine veröffentlichten Modelle für die Struktur von SGT-Proteinen. Die Schwierigkeit in der Erstellung eines solchen Modells liegt im C-Terminus des Proteins begründet (siehe Abbildung 5.1).

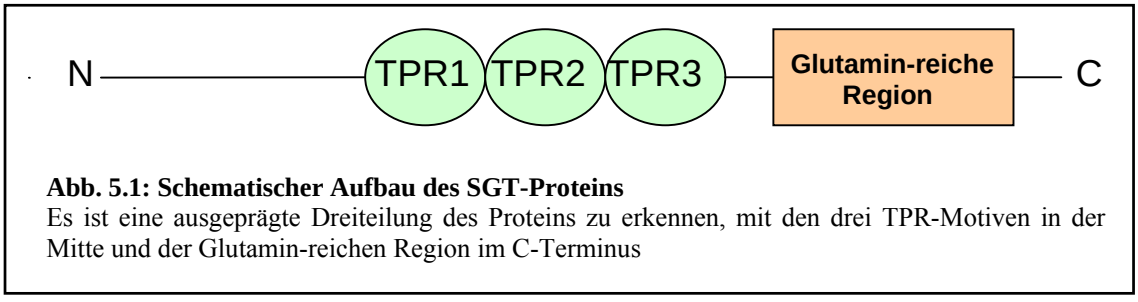


Abb. 5.1: Schematischer Aufbau des SGT-Proteins
Es ist eine ausgeprägte Dreiteilung des Proteins zu erkennen, mit den drei TPR-Motiven in der Mitte und der Glutamin-reichen Region im C-Terminus

Bisher ist nur sehr wenig über diesen Teil des Proteins bekannt, und auch Datenbankvergleiche zur Sequenz des C-Terminus zeigen keine Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinstrukturen. Ein „protein modelling“ nur für die TPR-Domäne innerhalb des hSGT-Proteins sollte aber durchaus möglich sein, da bereits einige Strukturen von TPR-Domänen anderer Proteine veröffentlicht wurden, zu denen die TPR-Domäne aus SGT eine hohe Homologie aufweist. Eine Sequenzähnlichkeit von über 50 % bedeutet auch eine hohe Strukturähnlichkeit.

Aber selbst bei erfolgreicher Strukturaufklärung mittels Röntgendiffraktometrie, kann die Kenntnis von der Tertiärstruktur (d.h. der Raumstruktur) nicht notwendigerweise ausreichen, die Funktion des Proteins zu bestimmen.

Eine Voraussetzung für die Strukturaufklärung von Proteinen mittels Röntgendiffraktometrie ist die dreidimensional-periodische Anordnungen der zu untersuchenden Moleküle, sprich: Protein-Kristalle. Proteinkristalle sind oft schwer zu züchten, sind sie aber schließlich in ausreichender Größe vorhanden, können sie für die Kristallstrukturanalyse genutzt werden. Für die Strukturaufklärung via Röntgenstrukturanalyse wird allerdings ein sogenannter Einkristall benötigt. Ein Einkristall (engl. single crystal) ist ein Kristall dessen Bausteine ein einheitliches, homogenes Kristallgitter bilden. Für die Strukturaufklärung ungeeignet sind dagegen polykristalline Aggregate oder amorphe Substanzen.

Für diese Arbeit wurde neben dimerisiertem His-hSGT-Fusionsprotein auch aufgereinigtes hSGT-Protein ohne Tag zur Kristallisation verwendet. Mit dem His-hSGT-Fusionsprotein gelang es einige Kristalle herzustellen, diese eigneten sich allerdings nicht für eine Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse, denn entweder waren sie nicht groß genug für eine Messung im Diffraktometer, oder sie streuten den Röntgenstrahl nicht und somit waren auch keine auswertbaren Reflexe auf dem Reflektor zu erkennen. Andere Kristalle stellten sich schlussendlich als Salzkristalle heraus.

Die in der Bedingung Crystal Screen 2, Nr. 43 gewachsenen nadelförmigen Proteinkristalle konnten durch eine Herabsenkung, sowohl der MPD-Konzentration auf 30 % als auch des pH-Wertes des Puffers von 8,5 auf 8,0 in ihrem Wachstum verbessert (vergrößert) werden.

Viele Proteine kristallisieren bei einem pH-Wert, der etwa um eins über oder unter dem isoelektrischen Punkt des Proteins liegt. Der isoelektrische Punkt des His-hSGT-Fusionsproteins liegt bei 5,6 (siehe Anhang 8.1.2). Es scheint sich zu bestätigen, dass

eine Absenkung des pH-Wertes von 8,5 auf 8,0 bei der Kristallisation des Fusionsproteins ein verbessertes Kristallwachstum herbeiführt. Eine zusätzliche Verringerung des pH-Wertes führte allerdings zu keinen weiteren positiven Effekten auf das Kristallwachstum.

Nach Zugabe des Additivs Mangan-Chlorid konnte das zusätzliche Wachstum kleiner drei-dimensionaler, pyramidenförmiger Kristalle beobachtet werden. Nach wie vor waren auch die nadelförmigen Kristalle in den untersuchten Bedingungen wiederzufinden. Die kleinen 3D-Kristalle konnten durch eine Kombination der Techniken „Micro- und Macro-Seeding“ vergrößert werden. Nachdem sie eine Größe erreicht hatten, die es ermöglichte, sie röntgendiffraktometrisch zu untersuchen, konnte nach einer Analyse der Reflexe auf dem Detektor ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Kristallen um Protein-Kristalle handelt. Sie zeigten das typische Muster für Salzkristalle. Nach dem Zusatz von Detergenzien in die Kristallisationstropfen konnten keine positiven Effekte auf das Kristallisationsverhalten des SGT-Proteins beobachtet werden.

Auch wenn erste Raster-Screens um die Ausgangsbedingung CS2 (Nr. 43) zu keinen Veränderungen in der Kristallform führten, scheint die verbesserte Bedingung von CS2 (Nr.43) nach einer Verringerung der MPD-Konzentration und des pH-Wertes, doch ein guter Ansatzpunkt für weitergehende Kristallisationsscreens zu sein.

5.5 Kristallisation des hSGT-Proteins

Die Kristallisation des hSGT-Protein ohne Markierung blieb bislang erfolglos. Auch die möglichen Proteinkristalle in der Bedingung CS2 (Nr. 43) des His-hSGT-Fusionsproteins ließen sich mit dem hSGT-Protein ohne tag nicht reproduzieren. Nach Auswertung aller durchgeführten „initial screens“ ließ sich auch keine Aussage zum Kristallisations- oder Präzipitationsverhalten des Proteins unter variierenden Bedingungen treffen. Es konnte z.B. keine Abhängigkeit der Präzipitationswahrscheinlichkeit vom pH-Wert, dem Einsatz von Alkoholen oder bestimmten Salzen in der Kristallisationslösung gefunden werden.

Sowohl beim Versuch der Kristallisation des Fusionsproteins als auch des hSGT-Proteins ohne tag trat in vielen Kristallisationsbedingungen das Phänomen der Phasenseparation auf. Bei diesem Phänomen kann das Protein innerhalb der „Öl-Tröpfchen“ sehr stark konzentriert aber noch flüssig sein und oft erscheinen nach

einiger Zeit Kristalle in diesen Bedingungen. In der vorliegenden Arbeit führte allerdings auch die Phasenseparation zu keiner Kristallbildung des SGT-Proteins. Dennoch könnten diese Bedingungen Ansatzpunkte für weitere Versuche liefern, indem das flüssige, konzentrierte Protein aus den „Öl-Tröpfchen“ für Seeding-Versuche (dem sogenannten „Streak-Seeding“) verwendet wird.

Das Problem bei allen Kristallisationsversuchen, sowohl mit dem His-hSGT-Fusionsprotein als auch mit dem hSGT-Protein ohne tag ist die Hetero-Oligomerisierung des selben. Nach wie vor ließen sich die zwei weiteren verkürzten SGT-Proteine, die in SDS-Gelen unterhalb der eigentlichen hSGT-Protein-Bande zu sehen sind (siehe Abbildungen 4.15 und 4.26), nicht aus der Proteinlösung abtrennen und mussten somit für die Kristallisationsversuche des hSGT-Proteins mitverwendet werden. Der wichtigste Punkt für zukünftige Kristallisationsversuche scheint somit die Ausarbeitung einer effektiveren Expressions- und Aufreinigungstrategie zu sein, mit dem Ziel der Herstellung von reinem (möglichst als Monomer vorliegendem) Volllängen-hSGT-Protein. Weitere Ursachen für die Schwierigkeiten bei der Kristallisation des SGT-Proteins könnten in seiner Sekundärstruktur begründet sein. Aus diesem Grund wurde die Aminosäuresequenz des humanen SGT-Proteins mit dem Programm PSIpredict auf seine Sekundärstruktur hin untersucht (siehe Abschnitt 5.6).

5.6 Strukturvorhersagen für das hSGT-Protein

Obgleich Information zur drei-dimensionalen Struktur des hSGT-Proteins bisher fehlen, kann eine Aussage zur Sekundärstruktur mit Hilfe bioinformatischer Methoden eine erste Annäherung zu Struktur und Funktion des Proteins geben. Bei genauerer Betrachtung der Sekundärstrukturvorhersage (siehe Abbildung 5.2) zeigt sich deutlich das verstärkte Vorkommen von α-helicalen Strukturen. Das Programm PSIpredict sagt insgesamt sechtzehn α-Helices für das hSGT-Protein voraus.

Mit Hilfe von NMR-Untersuchungen der TPR-Domäne des hSGT-Proteins fanden Pai *et al*. (2003) sich, dass diese Domäne aus sieben α-Helices besteht, die lokalisiert sind von Glu92-Lys103 (Helix 1), Phe107-Glu119 (Helix 2), Ala125-Lys137 (Helix 3), Tyr141-Ile154 (Helix 4), Ser159-Ser171 (Helix 5), His175-Leu186 (Helix6) und schließlich Glu193-Lys205 (Helix 7). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Sekundärstruktur-Voraussagen des Programms PSIpredict wieder (siehe Abbildung 5.2).

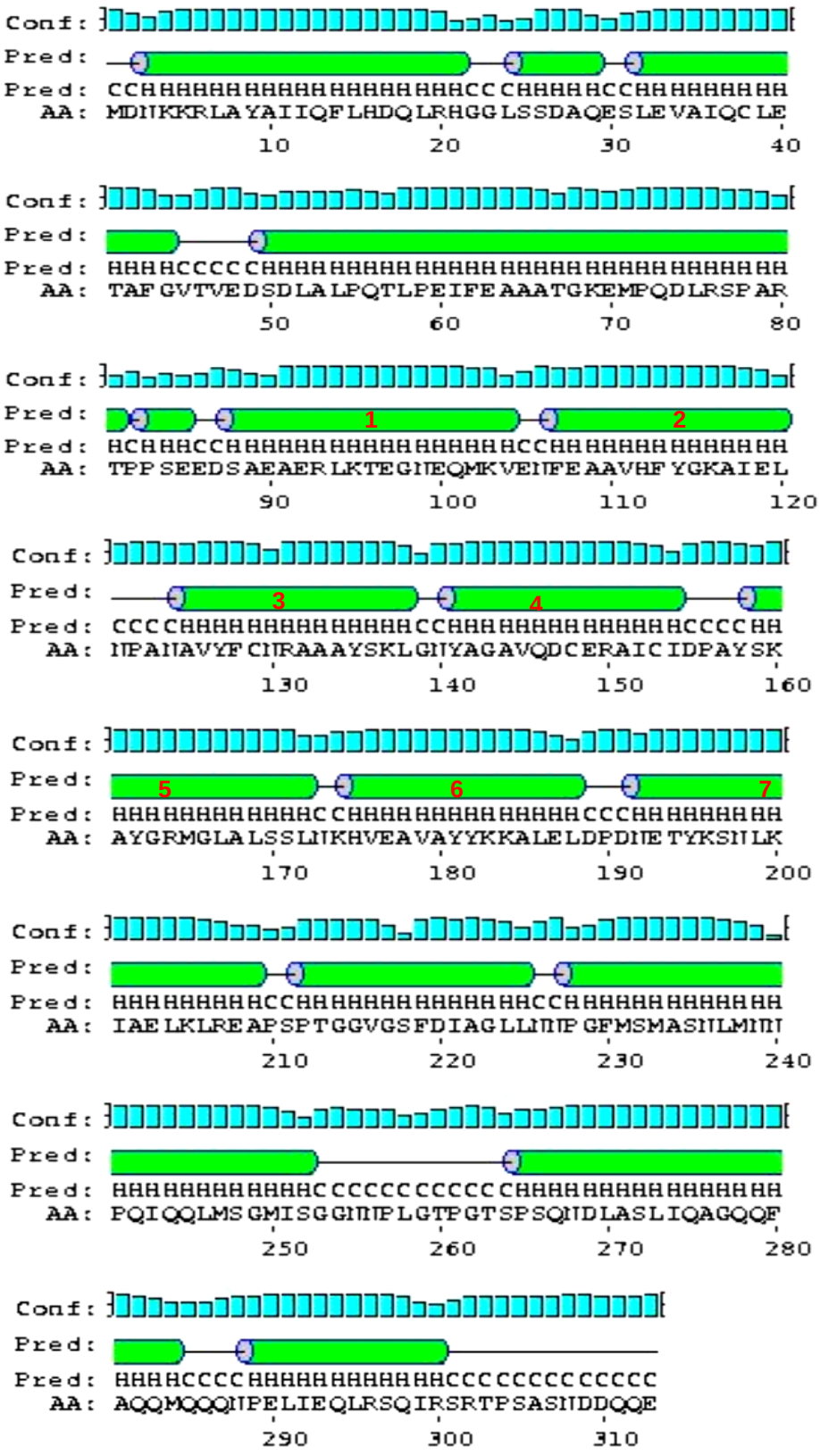


Abb. 5.2: Sekundärstrukturvorhersage für das humane SGT-Protein
Durch die Sekundärstrukturvoraussage durch das Programm PSIpredict zeigt sich deutlich das massive Auftreten von α-Helices (grüne Zylinder) innerhalb der SGT-Sequenz. Insgesamt sagt PSIpredict sechtzehn α-Helices für das SGT-Protein voraus. Die sieben α-Helices der TPR-Domäne wurden mit roten Zahlen markiert, und die Höhe der blau gefärbten Balken über den einzelnen Aminosäuren gibt die Konfidenz der Vorhersage wider. C = Coil; H = Helix

Viele frei über das Internet verfügbare Programme können die Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins mit denen bekannter Proteine vergleichen, deren Tertiärstruktur aufgeklärt wurde und somit über verschiedene Parameter die Ähnlichkeit mit bekannten Proteindomänen ermitteln. Alle verwendeten Programme identifizierten die drei TPR-Motive als bekannte Strukturen (siehe Abbildung 5.3). Das Programm ScanProsite auf der Internetseite www.expasy.org kann zusätzlich posttranslationale Modifikations-Stellen in der Sequenz von Proteinen identifizieren.

(hSGT, 313 AS)

PS50005 **TPR** *TPR repeat profile* :

91 - 124:
AERLKTEGNEQMKVENFEAAVHFYGKAIELNPAN

125 - 158:
AVYFCNRAAAYSKLGNYAGAVQDCERAICIDPAY

159 - 192:
SKAYGRMGLALSSLNKHVEAVAYYKKALELDPDN

PS50293 **TPR_REGION** *TPR repeat region circular profile* :

91 - 192:
AERLKTEGNEQMKVENFEAAVHFYGKAIELNPANAVYFCNRAAAYSKLGNYAGAVQDCER
AICIDPAYSKAYGRMGLALSSLNKHVEAVAYYKKALELDPDN

Abb. 5.3: Identifikation der TPR-Motive des humanen SGT-Proteins
Die Aminosäuresequenz des hSGT-Proteins wurde über das Programm ScanProsite untersucht. Es wurden 3 TPR-Motive gefunden, die sich zu einer TPR-Domäne vereinigen.

ScanProsite ermittelte in der hSGT-Sequenz acht potentielle N-Myristylierungsstellen, sechs Phosphorylierungsstellen für das Enzym Casein Kinase II, zwei Phosphorylierunsstellen für die Protein Kinase C, eine Phosphorylierunssequenz für die Tyronsin-Kinase und eine N-Glycosylierungsstelle (siehe Anhang 8.5). Posttranslationale Modifikationen sind für die biologische Aktivität der meisten Proteine äußerst wichtig. Prokaryoten können keine posttranlationalen Modifikationen durchführen, weil ihnen dafür die notwendigen Enzyme fehlen, daher können viele

eukaryotische Proteine auch nur in eukaryotischen Wirtszellen korrekt exprimiert werden (Stryer, 1994).

In ^{32}P-Markierungs-Experimenten und 2D-Analysen konnte gezeigt werden, dass das SGT-Protein NS1-spezifisch an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird (Apsi, 2002). Die Phosphorylierung von Proteinen kann einen Einfluss auf deren Bindungsfähigkeit an andere Proteine ausüben. Miyata *et al*. (1997) untersuchten einen ähnlichen Fall, in dem unphosphoryliertes FKBP52-Protein in der Lage ist an Hsp90 zu binden. Nach einer Phosphorylierung durch die Casein Kinase II aber verliert das FKBP52-Protein diese Fähigkeit.

Für ein besseres Verständnis der Funktionen des humanen SGT-Proteins reicht es nicht aus, seine drei-dimensionale Struktur aufzuklären. Ferner sollten seine Interaktionen mit anderen Proteinen wie dem NS1-Protein oder dem Chaperon Hsc70 näher in den Blickpunkt der Forschung gerückt werden. In den Untersuchungen zu dem Dreier-Chaperon-Komplex aus CSP/SGT/Hsc70 konnte dem SGT-Protein eindeutig eine Cochaperonfunktion nachgewiesen werden. Indem das SGT-Protein die ATPase des Hsc70 aktiviert, wird der Dreierkomplex befähigt z. B. ungefaltete Luciferase zu renaturieren (Tobaben *et al*., 2001). Für viele virale Prozesse wie die DNA-Replikation oder die Verpackung des viralen Genoms wurde in Infektionsmodellen anderer Viren die Beteiligung von Chaperonkomplexen bereits nachgewiesen. Da man vermutet, dass SGT auch in der parvoviralen Replikation die Funktion eines Cochaperons übernimmt, und Hsc70 in APAR-Bodies nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt die Frage offen, wer die Funktion des Chaperons im Komplex mit SGT einnimmt. Momentan wird diskutiert, ob nicht auch das NS1-Protein eine Chaperonaktivität aufweisen könnte in einem Komplex mit SGT. Denn auch das NS1-Protein besitzt eine ATPase, die möglicherweise durch SGT aktiviert werden kann. Bei den meisten Chaperon-unterstützten Reaktionen ist die Hydrolyse von ATP essentiell (Apsi, 2002).

SGT ist ein ubiquitär exprimiertes und evloutionär konserviertes Protein. Bisher wurden die Gene, die für das small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing (SGT) Protein codieren nur in eukaryotischen Organismen von Hefen über Nematoden und Fliegen bis hin zu den Säugetieren gefunden. Die Auswertung eines Sequenz-Alignments von vier unterschiedlichen SGT-Proteinen kann in Abschnitt 1.1 nachgelesen werden. Über die Biochemische Funktion des SGT-Proteins in der Zelle ist bisher allerdings nur wenig bekannt. Weiterhin ist auch unbekannt, wo und durch welche Enzyme das SGT-Protein in der Zelle posttranslational modifiziert wird, und in

wie weit Phosphorylierungen des SGT-Proteins eine regulatorische Rolle spielen können.

Für die Zielsetzung der Kristallisation des SGT-Proteins, kombiniert mit Untersuchungen zur Funktion des Proteins, bietet sich deshalb eine Expression des eukaryotischen SGT-Proteins in Hefezellen an. Die Proteinexpression in Hefezellen kombiniert die Vorteile der Bereitstellung der meisten eukaryotischen post-translationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung oder Glycosylierung mit hohen Expressionsraten, die für Kristallisationsversuche essentiell sind.

Auf diesem Weg könnte auch die Problematik des vorzeitigen mRNA-Abbaus in *E. coli* BL21 (DE3) RIL umgangen werden (siehe Abschnitt 5.2).

6. Zusammenfassung

Eine häufig auftretende und trotz intensiver Forschung noch immer nahezu unheilbare Tumorerkrankung ist das Glioblastom. Derzeit wird ein neuer Behandlungsansatz erforscht, bei dem Tumorzellen durch Injektion von Parvoviren abgetötet werden sollen. Die Fähigkeit der Parvoviren, Wachstum und Etablierung experimentell induzierter Tumoren zu hemmen, hängt vermutlich mit dem Nicht-Strukturprotein 1 (NS1), zusammen, dem wohl wichtigsten regulatorischen Faktor in Parvoviren. Zelluläre Proteine, die mit NS1 interagieren, stellen somit auch potentielle Zielmoleküle für die Behandlung des Glioblastoms mit Hilfe autonomer Parvoviren dar. Ein solches Protein ist das SGT, welches im Mittelpunkt dieser Arbeit stand. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer geeigneten Expressions- und Aufreinigungsstrategie für das humane SGT-Protein. Anschließend sollten Kristallisationsversuche durchgeführt werden, um mittels Röntgenbeugungsexperimenten Daten für die Strukturaufklärung zu erhalten.

Hierzu wurden verschiedene Expressions- und Aufreinigungsstrategien etabliert, mit dem Ziel größere Mengen an möglichst reinem hSGT-Protein in *E. coli* zu exprimieren. SGT konnte hochrein, als Mischung von Volllängenprotein und zwei vom C-Terminus verkürzten SGT-Fragmenten, aufgereinigt werden. Zum einen wurde hSGT durch Proteasespaltung des aufgereinigten GST-hSGT-Fusionsproteins gewonnen, zum anderen wurde His-hSGT-Fusionsprotein aufgereinigt und kristallisiert. Während dieser Arbeit konnten erste Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die durch weitergehende Optimierung zukünftige Röntgenstrukturanalysen erlauben könnten.

Darüberhinaus konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals Erkenntnisse zum Oligomerisierungsverhalten des hSGT-Proteins in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen gewonnen werden, wie z.B. die Inkubationstemperatur der Proteinexpression. Nach einer Verringerung der Temperatur, und damit einer verlängerten Expressionszeit, konnte neben tetramerem SGT-Protein auch dimeres SGT hergestellt werden. In diesem Zusammenhang konnten durch UV-spektrometrische Untersuchungen Hinweise auf eine unspezifische Aggregation innerhalb des tetrameren SGT-Komplexes gewonnen werden. In einem SGT-Dimer fanden sich dagegen keine Hinweise auf eine unspezifische Aggregation. Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, dass zwei SGT-Dimere unspezifisch aggregieren, während die Dimere aus zwei spezifisch miteinander interagierenden SGT-Proteinen bestehen. Auch die Größe einer N-terminalen Markierung zeigte einen Einfluß auf das Oligomerisierungsverhalten des

SGT-Proteins. Mit Hilfe dieser GST-Markierung war es nun erstmals möglich, das SGT-Protein in monomerer Form als GST-hSGT-Fusionsprotein herzustellen. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, die Fähigkeit des SGT zur Oligomerisierung liege in seinem N-Terminus begründet.

6.1 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß SGT spezifisch Dimere bildet. Nur unter diesen Bedingungen war es möglich erste Proteinkristalle zu erhalten. Die Bedingungen, in denen diese SGT-Kristalle wuchsen stellen nach weitergehenden Optimierungen eine gute Grundlage für zukünftige Kristallisationsversuche dar. Auch „streak-seeding“-Versuche aus Bedingungen mit Phasenseparation könnten helfen, Einkristalle für röntgendiffraktometrische Untersuchungen zu erhalten.

Um kurzfristig die Probleme des mRNA-Abbaus innerhalb der *E. coli*-Zellen zu verringern, bietet sich eine Erhöhung der Inkubationstemperatur und damit auch eine Verkürzung der Proteinexpression an. Dies bedeutet zwar eine geringere Ausbeute an SGT, aber auch einen verhältnismäßig größeren Anteil an Volllängenprotein. Ein weiteres Problem nach einer Erhöhung der Inkubationstemperatur besteht aber darin, dass nach einer relativ kurzen Expression fast ausschließlich unspezifisch aggregierte tetramere SGT-Komplexe aufgereinigt werden konnten. Deshalb wäre es ratsam, die Probleme des mRNA-Abbaus längerfristig durch die Verwendung eines RNase E defizienten *E. coli*-Stammes für die Proteinexpression zu umgehen.

Erste Anzeichen sprechen dafür, dass das SGT-Protein in vivo als Dimer vorliegt. Auch aus diesem Grund sollten größere N-terminale Markierungen vor der Kristallisation des SGT abgespalten werden, da sie dem Protein die Möglichkeit zur Dimerisation, die innerhalb des N-Terminus begründet ist, nehmen können. Durch weitergehende Untersuchungen sollten diese Vermutungen aber noch erhärtet werden.

Für die Verhinderung evtl. Abbauvorgänge am C-Terminus des Proteins sollte der C-Terminus des SGT-Proteins durch eine weiter Markierung geschützt werden. Es ist darauf zu achten, dass beide Markierungen, sowohl am N- als auch am C-Terminus gut abspaltbar sind, um Interaktionen dieser Markierungen mit dem Protein während der Kristallisation von vornherein auszuschließen.

Diese projizierten Versuche werden sicherlich auf lange Sicht hin gesehen die Möglichkeit bieten, die drei-dimensionale Struktur des SGT-Protein aufzukären.

Für ein besseres Verständnis der Funktionen des SGT-Proteins reicht es allerdings nicht aus, seine drei-dimensionale Struktur aufzuklären. Ferner sollten seine Interaktionen mit anderen Proteinen wie dem NS1-Protein näher in den Blickpunkt der Forschung gerückt werden.

Die Charakterisierung der Aktivierbarkeit der ATPase von NS1 durch das SGT-Protein ist eine dieser noch zu untersuchenden Fragestellungen. Eine andere beschäftigt sich mit den Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikationen des SGT-Proteins durch NS1. Und auch die Vermutung, der SGT/NS1-Komplex könnte Chaperonfunktion besitzten, muß jedoch noch erhärtet werden.

Für die Zielsetzung der Kristallisation des SGT, kombiniert mit Untersuchungen zur Funktion des Proteins, bietet sich deshalb eine Expression des eukaryotischen SGT-Proteins in Hefezellen an. Die Proteinexpression in Hefezellen kombiniert die Vorteile der Bereitstellung der meisten eukaryotischen post-translationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung oder Glycosylierung mit hohen Expressionsraten, die für Kristallisationsversuche essentiell sind.

6.2 Summary

The glioblastoma is a frequently occurring tumor which is nearly incurable, despite intensive research. Injection of parvoviruses has been developed as a treatment strategy. The ability of parvoviruses to restrain growth and establishment of experimentally induced tumors is probably connected to the non-structure protein 1 (NS1), the presumably most important regulatory factor of autonomous parvoviruses. Cellular proteins interacting with NS1, thus represent potential target molecules for the treatment of glioblastoma with autonomous parvoviruses. One of those cellular interacting factors identified for the NS1 is the SGT protein, which is the focus of this work. The intention of this diploma work was the establishment of a proper strategy for expression and purification of the humane SGT protein. Subsequently, crystallization experiments should be carried out, followed by X-ray diffraction for clarification of the 3D-structure of the hSGT-protein. Different expression- and purification-strategies were established to produce substantial quantities of pure hSGT protein in *E. coli*. SGT was obtained in a highly purified form. The full length protein and two SGT fragments shortened at the C-terminus were separated. On the one hand hSGT was extracted by cleavage of the GST-hSGT fusion protein by PreScission protease and on the other hand the His-hSGT fusion protein was purified and crystallized. Initial crystallization conditions were found, which permit future x-ray structure analyses by further optimization of these conditions. This is the first relsult which shows this kind of oligomerization of human SGT under different conditions. The oligomerization depends for example on the incubation temperature of the expression. The dimerized and tetramerited SGT proteins could be obtained after a decrease in temperature and an extended expression time. After a decrease of temperature, and thus an extended expression time, dimerized SGT could be produced as well as tetramerized SGT protein. In this context references for a nonspecific aggregation could be found within the tetramerized SGT complex by UV-spectrometric investigations. In dimerized SGT no evidences for a nonspecific aggregation could be found. From these data it can be assumed that two SGT-dimers aggregate non-specifically whereas the subunits of the dimers interact specifically. Also the size of the N-terminal tag showed an influence on the kind of oligomerization of SGT. For the first time it was possible to purify the SGT in monomeric form as GST-hSGT fusion protein. These results support the assumption, that the N-terminus of SGT mediates the ability for oligomerization.

7 Literaturverzeichnis

Angeletti, P. C., Walker, D. and Panganiban, A. T. (2002): Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. Cell Stress & Chaperones 7 (3): 258-268

Apsi, X. (2002): Funktion des SGT/NS1-Komplexes im Lebenszyklus autonomer Parvoviren. Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Babitzke, P., Granger, L., Olszewski, J. and Kushner, S. R. (1993): Analysis of mRNA decay and rRNA processing in Escherichia coli multiple mutants carrying a deletion in RNase III. J. Bacteriol. **175** (1): 229-239

Belasco, J. G. and Higgins, C. F. (1988): Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. Gene **72** (1-2): 15-23

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid Res. 7: 1513-1523

Blatch, G. L. and Lassle, M. (1999): The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. Bioessays. **21** (11): 932-939.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72: 248-254

Brinker, A., Scheufler, C., von der Mülbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I. and Hartl, U. (2002): Ligand Discrimination by TPR domains. J. Biol. Chem. **277** (22): 19265-19275

Callahan, M. A., Handley, M. A., Lee, Y. H., Talbot, K. J., Harper J. W. and Panganiban, A. T. (1998): Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. J. Virol. **72** (6): 5189-5197

Carlson, C. J., Booth, F. W. and Gordon, S. E. (1999): Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. Am. .J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **277** (2): R601-R606

Chamberlain, L. H. and Burgoyne, R. D. (1997): The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. J. Biol. Chem. **272** (50): 31420-6

Christensen, J., Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1997): A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. J Virol. 71 (2): 1405-1416.

Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Prc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114

Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1986): Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. J Virol. 58 (3): 724-32.

Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1987): The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. Adv Virus Res. 33: 91-174.

Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1998): High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. J Virol. 72 (11): 8477-8484.

Cyr, D. M., Langer, T. and Douglas, M. G. (1994): DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. Trends Biochem. Sci. **19** (4): 176-81

Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J. and Jauniaux, J. (1998): Identification of a Novel Cellular TPR-Containing Protein, SGT, That Interacts with the Nonstructural Protein NS1 of Parvovirus H-1. J. Virol. **72** (5): 4149-4156

Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P. and Rommelaere, J. (2000): H-1 Parvovirus-Associated Replication Bodies: a Distinct Virus-Induced Nuclear Structure. J. Virol. **74** (10): 4807-4815

D'Andrea, L. D. and Regan, L. (2003): TPR proteins: the versatile helix. Trends Biochem. Science 28 (12): 655-662

D'Arcy, A., Elmore, C., Stihle, M. and Johnston, J. E. (1996): A novel approach to crystallizing proteins under oil. Journal of Crystal Growth **168**: 175-180

Das, A. K., Cohen, P. W. and Barford, D. (1998): The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. EMBO J. **17** (5): 1192-1199

Demand, J., Lüders, J. and Höhfeld, J. (1998): The Carboxy-Terminal Domain of Hsp70 provides Binding Sites for a Distinct Set of Chaperone Cofactors. Molecular and Cellular Biology 18 (4): 2023-2028

Donovan, E. P. and and Kushner S. R. (1986): Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** (1): 120–124

Dupressior, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N. and Rommelaere, J. (1989): Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. Cancer Res. 49 (12): 3203-3208

Evans, G. J. O., Morgan, A. and Burgoyne, R. D. (2003): Tying Everything Together: The Multiple Roles of Cysteine String Protein (CSP) in Regulated Exocytosis. Taffic 4: 653-659

Feige, U. and Polla, B. S. (1994): Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. Experientia **50** (11-12): 979-86

Fonte, V., Kapulkin, V., Taft, A., Fluet, A., Friedman, D. and Link, C. D. (2002): Interaction of intracellular β amyloid peptide with chaperone proteins. PNAS **99** (14): 9439-9444

Goebl, M. and Yanagida, M. (1991): The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. Trends Biochem. Sci. **16** (5): 173-7

Guetta, E., Graziani, Y. And Tal, J. (1986): Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. J. Natl Cancer Inst. 76 (6): 1177-1180

Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. (2002): Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science **295** (5561): 1852-8

Helmbrecht, K., Zeise, E. and Rensing, L. (2000): Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. Cell Prolif 33 (6): 341-65

Herrero Y Calle M., Cornelis J. J., Herold-Mende C., Rommelaere J., Schlehofer J. R., Geletneky K. (2004): Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. Int J Cancer **109** (1):76-84

Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K. and Yanagida, M. (1990): Snap helix with knob and hole: essential repeats in S. pombe nuclear protein nuc2+. Cell **60** (2): 319-28

Hohfeld, J., Minami, Y. and Hartl, F. U. (1995): Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. Cell **83** (4): 589-98

Hohfeld, J., Cyr D. M. and Patterson, C. (2001): From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. EMBO Rep. **2** (10): 885-90

Honore, B., Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Vandekerckhove, J. and Celis, J. E. (1992): Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. J Biol Chem. **267** (12): 8485-91

Jasiecki, J. and Wegrzyn, G. (2003): Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. EMBO reports **4** (2): 172-177

Jacoby, R. O., Johnson, E. A., Ball-Goodrich, L., Smith, A. L. and McKisic, M. D. (1995): Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization. J Virol. 69 (6): 3915-3919.

Kordes, E., Savelyeva, L., Schwab, M., Rommelaere, J., Jauniaux, J. and Cziepluch, C. (1998): Isolation and Characterization of Human *SGT* and identification of Homologues in *Saccheromyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. Genomics **52**: 90-94

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. und Cox, M. M. (1994): Prinzipien der Biochemie Spektrum akademischer Verlag GmbH, 2. Auflage

Liu, F., Wu, S., Hsiao, C. and Wang, C. (1999): Specific Interaction of the 70-kDa Heat Shock Cognate Protein with the Tetratricopeptide Repeats. J. Biol. Chem. **274** (48): 34425-34432

Main, E. R. G., Xiong, Y., Cocco, M. J., D'Andrea, L. and Regan, L. (2003): Design of Stable α-Helical Arrays from an Idealized TPR Motif. Structure **11**: 497-508

Mastrogiacomo, A., Parsons, S. M., Zampighi, G. A., Jenden, D. J., Umbach, J. A. and Gundersen, C. B. (1994): Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca2+ channels. Science **263** (5149): 981-2

Miyata, Y., Chambraud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M. C., Renoir, J. M., Shirai, R., Catelli, M. G., Yahara, I. and Baulieu E. E. (1997): Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (26): 14500-14505.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 (1): 263-273

Nuesch, J. P., Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1995): Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. Virology. 209 (1): 122-135.

Pai, M., Yang, C., Tzeng, S., Wang, C. and Cheng. J. (2003): Letter to the Editor: ^{1}H, ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of the Tetratricopeptide Repeat (TPR) Domain of hSGT. J. Biomolecular NMR **26**: 381-382

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.; Hrsg. (1989): Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (12): 5463-5467

Schantl, J. A., Roza, M., De Jong, A. P. and Strous, G. J. (2003): Small gultamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGT) interacts with the ubiquitin-dependent endocytosis (UbE) motif of the growth hormone receptor. Biochem. J. **373**: 855-863

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegorano, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. and Moarefi, I. (2000): Structure of TPR Domain-Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine. Cell. **101**: 199-210

Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebl, M. and Hieter, P. (1990): A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. Cell. **60** (2): 307-17.

Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M. K., Hartl, F. U. and Wanker, E. E. (2001): Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. Hum Mol Genet. **10** (12): 1307-15

Smith, H. O. and Nathans, D. (1973): A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. J. Mol. Biol. 81: 419-423

Steiner, H. H., Bonsanto, M. M., Beckhove, P., Brysch, M., Geletneky, K., Ahmadi, R., Schuele-Freyer, R., Kremer, P., Ranaie, G., Matejic, D., Bauer, H., Kiessling, M., Kunze, S., Schirrmacher, V. and Herold-Mende, C. (2004): Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. J Clin Oncol. 22 (21): 4272-4281

Sterky, F., Holmberg, A., Pettersson, B. and Uhlen,M. (1996): The sequence of a 30 kb fragment on the left arm of chromosome XV from Saccharomyces cerevisiae reveals 15 open reading frames, five of which correspond to previously identified genes. Yeast 12 (10B Suppl):1091-5

Stryer, L. (1994): Biochemie. Spektrum akademischer Verlag GmbH, 3. Auflage

Stuart, R. A., Cyr, D. M. and Neupert, W. (1994): Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. Experientia **50** (11-12): 1002-11

Van der Spuy, J., Kana, B. D., Dir, H. W. and Blatch, G. L. (2000): Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. Biochem. J. **345**: 645-651

Tobaben, S., Varoqueaux, F., Brose, N., Stahl, B. and Meyers, G. (2003): A Brain – specific Isoform of Small Glutamine-rich Tetratricopeptide Reapeat-containing Protein Binds to Hsp70 and the Cysteine String Protein. J. Biol. Chem. **278** (40): 38376-38383

Tobaban, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Südhof, T. C., Rettig, J. and Stahl, B. (2001): A Trimeric Protein Complex Functions as a Synaptic Chaperone Machine. Neuron **31**: 987-999

Toolan, H. W. (1960): Production of a "mongolian-idiot" like abnormality in hamsters. Fed. Proc. 19: 208

Toolan, H. W. (1967): Lack of oncogenic effedt of the H-viruses for hamsters. Nature 214 (92) 1036

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354

Tsai, J. and Douglas, M. G. (1996): A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. J. Biol. Chem. **271** (16): 9347-54.

Wang, H., Zhang, Q. and Zhu, D. (2003): hSGT interacts eith the N-terminal region of myostatin. Biochem. And Biophysical Research Communications **311**: 877-883

Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W. and Astell, C. R. (1991): Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. Virology. 185 (1): 90-98.

Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., et al. (1994): 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. Nature **368** (6466):32-8

Winnefeld, M., Rommeleare, J. and Cziepluch, C. (2003): The human small glutamine-rich TPR-containing protein is required for progress through cell division. Experimantal Cell Research **293**: 43-57

Wrzesinski, C. (2002): Autonome Parvoviren – Entwicklung einer zweiten Generation von Vektoren für die Tumor-Gentherapie und Untersuchung des Einflusses der Infektion auf die zelluläre Genexpression. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Wu, S., Liu, F., Hu, S. and Wang, C. (2001): Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins. Biochem. J. **359**: 419-426

8 Anhang

8.1 Daten zum theoretischen pI-Wert und zum Molekulargewicht des hSGT-Proteins

Die folgenden Daten wurden mit dem Programm PeptideMass berechnet. Dieses Programm ist zu finden auf der Homepage des ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics.

8.1.1 hSGT-Protein (acession NM_003021)

```
     1          11         21         31         41         51
     |          |          |          |          |          |
   1 MDNKKRLAYA IIQFLHDQLR HGGLSSDAQE SLEVAIQCLE TAFGVTVEDS DLALPQTLPE    60
  61 IFEAAATGKE MPQDLRSPAR TPPSEEDSAE AERLKTEGNE QMKVENFEAA VHFYGKAIEL   120
 121 NPANAVYFCN RAAAYSKLGN YAGAVQDCER AICIDPAYSK AYGRMGLALS SLNKHVEAVA   180
 181 YYKKALELDP DNETYKSNLK IAELKLREAP SPTGGVGSFD IAGLLNNPGF MSMASNLMNN   240
 241 PQIQQLMSGM ISGGNNPLGT PGTSPSQNDL ASLIQAGQQF AQQMQQQNPE LIEQLRSQIR   300
 301 SRTPSASNDD QQE
```

Theoretical pI: 4.81 / Mw (average mass): 34063.08 / Mw (monoisotopic mass): 34041.69

8.1.2 hSGT-His-Tag-Fusionsprotein über pET16b aufgereinigt

```
     1          11         21         31         41         51
     |          |          |          |          |          |
   1 MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMDNKKRLAY AIIQFLHDQL RHGGLSSDAQ ESLEVAIQCL    60
  61 ETAFGVTVED SDLALPQTLP EIFEAAATGK EMPQDLRSPA RTPPSEEDSA EAERLKTEGN   120
 121 EQMKVENFEA AVHFYGKAIE LNPANAVYFC NRAAAYSKLG NYAGAVQDCE RAICIDPAYS   180
 181 KAYGRMGLAL SSLNKHVEAV AYYKKALELD PDNETYKSNL KIAELKLREA PSPTGGVGSF   240
 241 DIAGLLNNPG FMSMASNLMN NPQIQQLMSG MISGGNNPLG TPGTSPSQND LASLIQAGQQ   300
 301 FAQQMQQQNP ELIEQLRSQI RSRTPSASND DQQE
```

Theoretical pI: 5.56 / Mw (average mass): 36583.74 / Mw (monoisotopic mass): 36560.80

8.1.3 hSGT-Protein über pGEX6P1+1 aufgereinigt, GST-Tag mit PreScission Protease entfernt

```
     1          11         21         31         41         51
     |          |          |          |          |          |
   1 GPLGSPNSRM DNKKRLAYAI IQFLHDQLRH GGLSSDAQES LEVAIQCLET AFGVTVEDSD    60
  61 LALPQTLPEI FEAAATGKEM PQDLRSPART PPSEEDSAEA ERLKTEGNEQ MKVENFEAAV   120
 121 HFYGKAIELN PANAVYFCNR AAAYSKLGNY AGAVQDCERA ICIDPAYSKA YGRMGLALSS   180
 181 LNKHVEAVAY YKKALELDPD NETYKSNLKI AELKLREAPS PTGGVGSFDI AGLLNNPGFM   240
 241 SMASNLMNNP QIQQLMSGMI SGGNNPLGTP GTSPSQNDLA SLIQAGQQFA QQMQQQNPEL   300
 301 IEQLRSQIRS RTPSASNDDQ QE
```

Theoretical pI: 4.87 / Mw (average mass): 34929.03 / Mw (monoisotopic mass): 34907.13

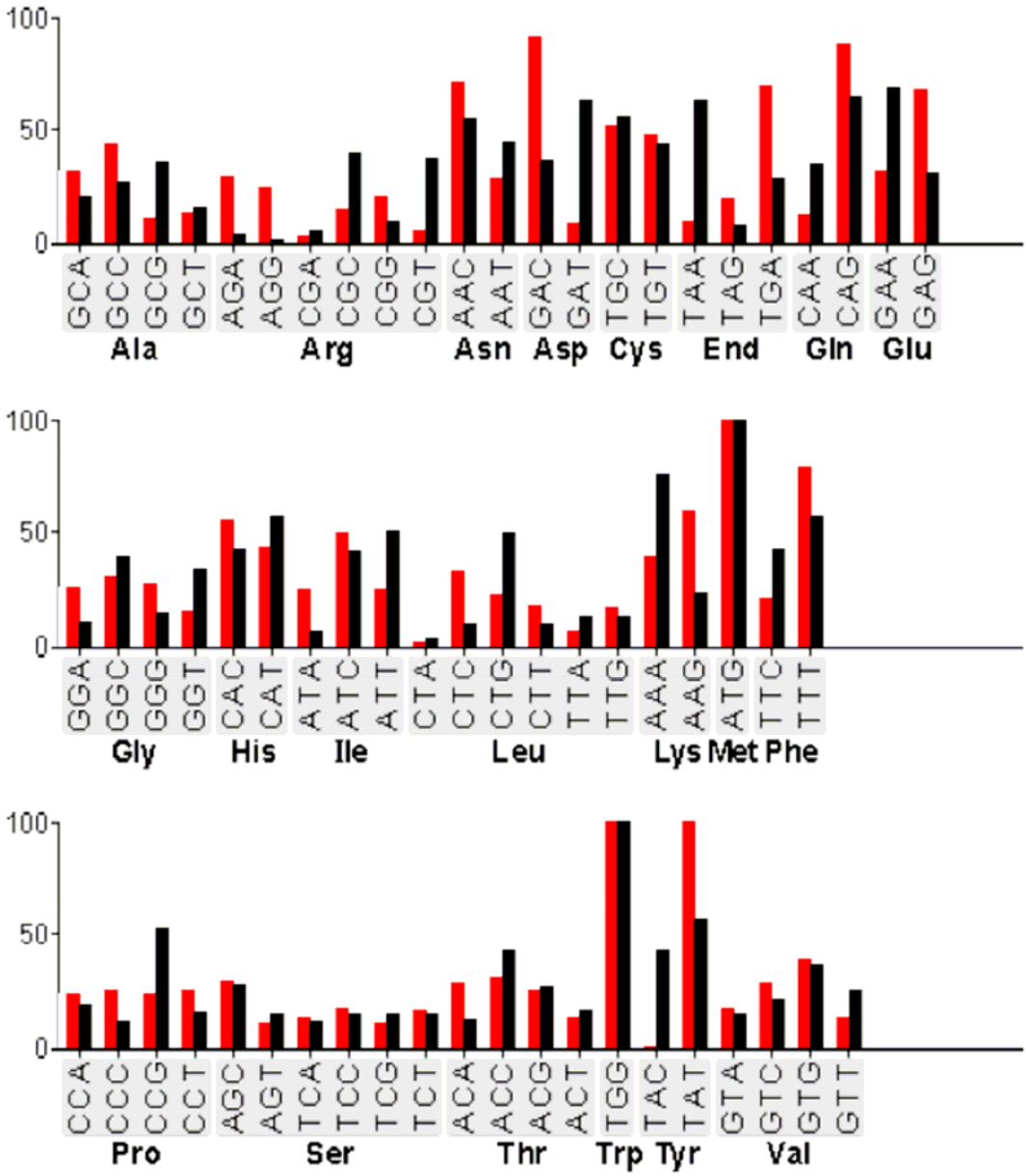
8.2 Codon Usage von *E. coli* für das hSGT-Protein

Die folgenden Diagramme wurden mit der Software: GCUA (graphical codon usage analyser) erstellt. Dieses Programm wurde von Herrn Thomas Schödl entwickelt und ist unter folgender Internetadresse zu finden: http://gcua.schoedl.de

hSGTcodon fraction colored in red

sequence derived from Homo_sapiens

Codontable (black): Escherichia_coli_K12 Mean difference: 16.94 %

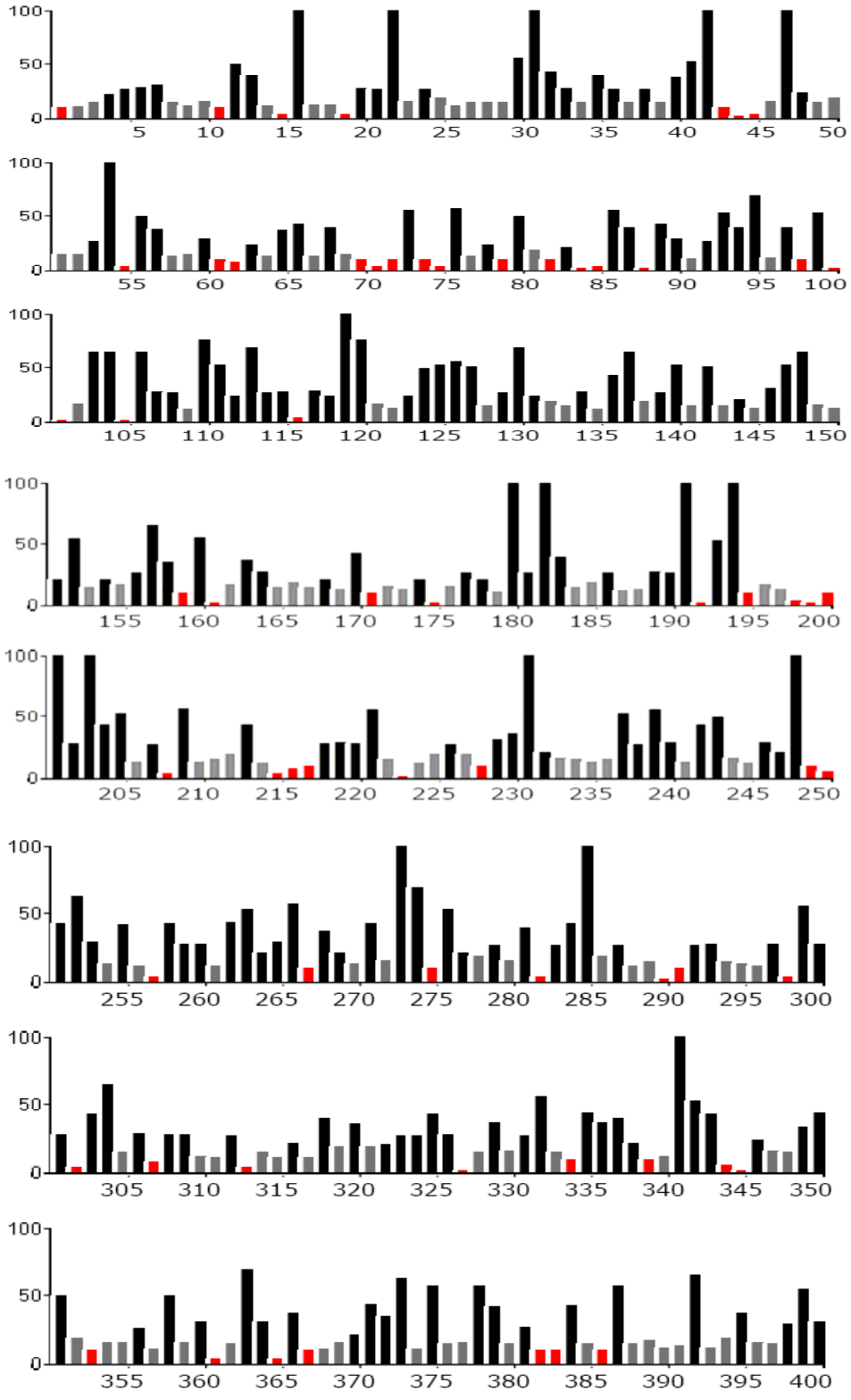

100
50
0
GCA GCC GCG GCT AGA AGG CGA CGC CGG CGT AAC AAT GAC GAT TGC TGT TAA TAG TGA CAA CAG GAA GAG
Ala Arg Asn Asp Cys End Gln Glu
100
50
0
GGA GGC GGG GGT CAC CAT ATA ATC ATT CTA CTC CTG CTT TTA TTG AAA AAG ATG TTC TTT
Gly His Ile Leu Lys Met Phe
100
50
0
CCA CCC CCG CCT AGC AGT TCA TCC TCG TCT ACA ACC ACG ACT TGG TAC TAT GTA GTC GTG GTT
Pro Ser Thr Trp Tyr Val

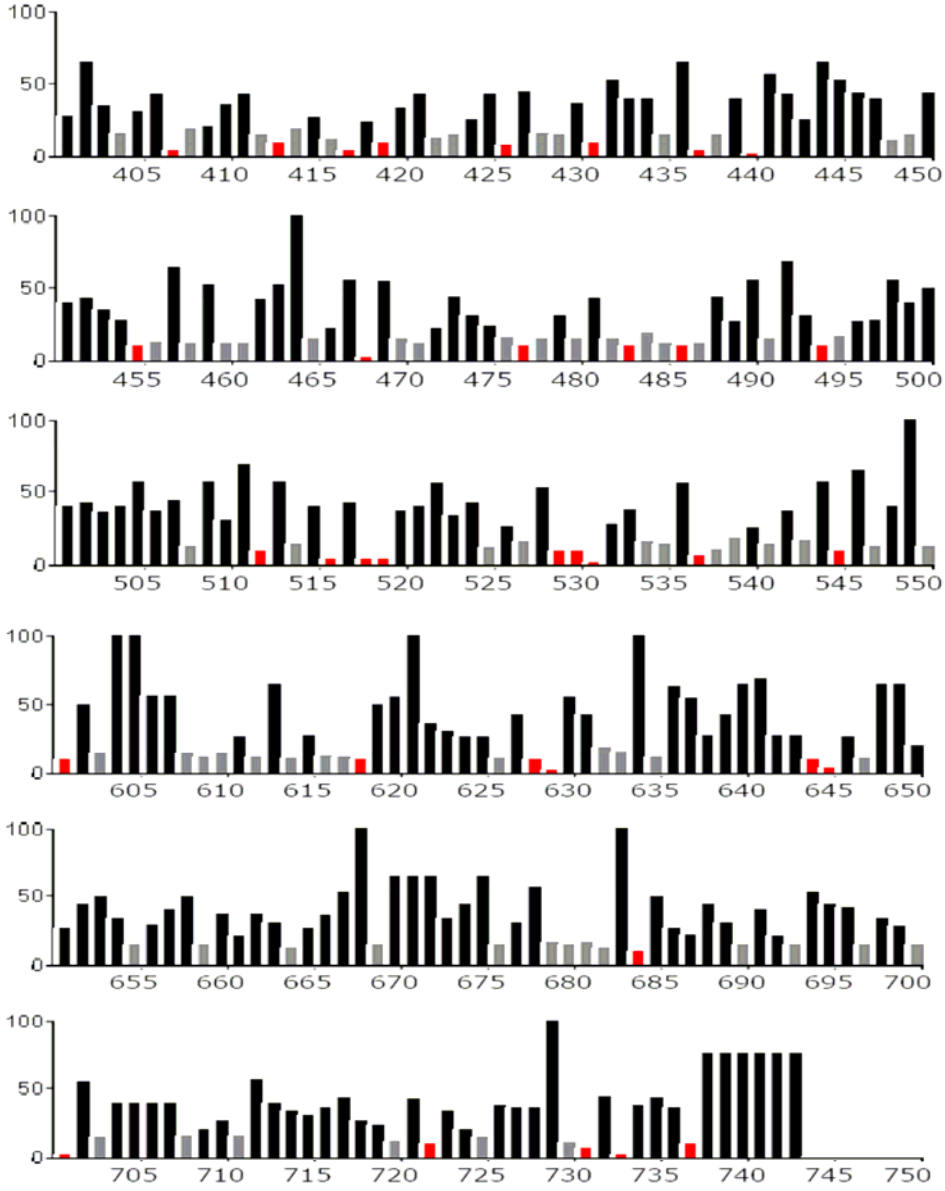
8.3 Codon Usage von *E. coli* für jedes Codon aus der *hSGT*-Gensequenz

hSGTthreshold 1: **20% (grey)**

threshold 2: **10% (red) sequence derived from Homo_sapiens**

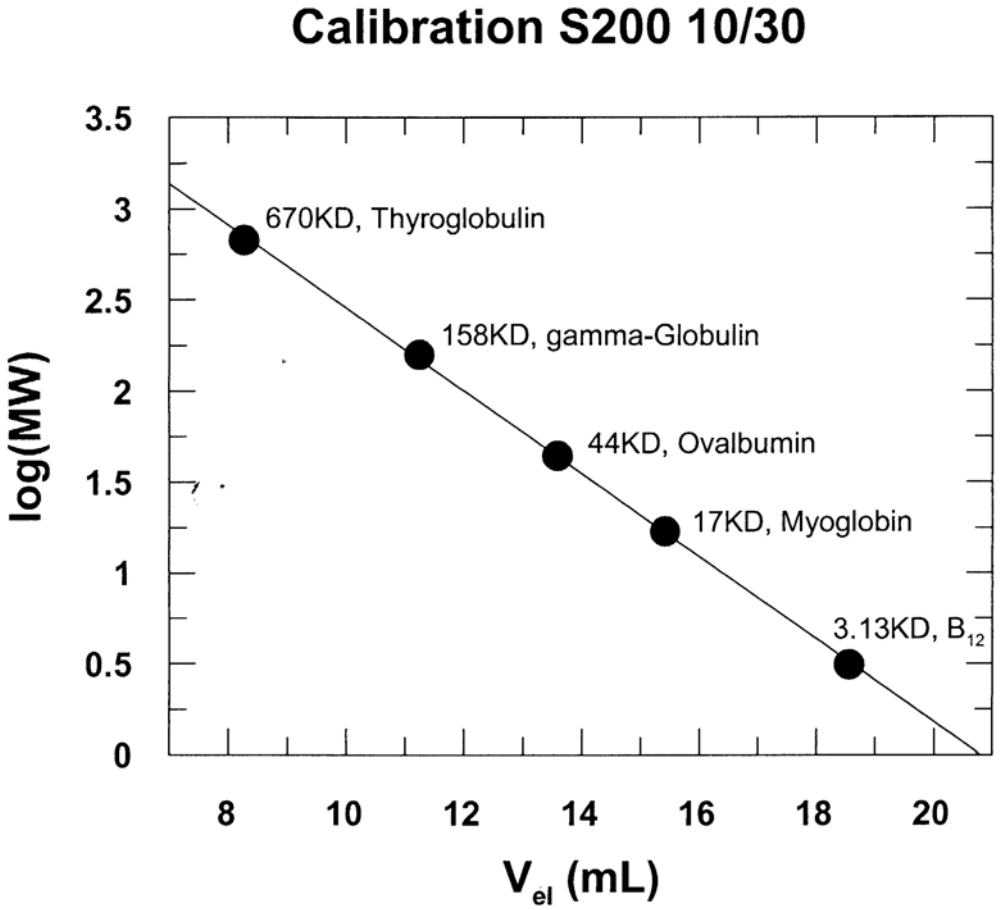
Codontable: **Escherichia_coli_K12**




100
50
0
405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
100
50
0
455 460 465 470 475 480 485 490 495 500
100
50
0
505 510 515 520 525 530 535 540 545 550
100
50
0
605 610 615 620 625 630 635 640 645 650
100
50
0
655 660 665 670 675 680 685 690 695 700
100
50
0
705 710 715 720 725 730 735 740 745 750

8.4 Auswertung für die Kalibrierung der Superdex S200 (10/30)-Säule

Auswertung für die Kalibrierung der Superdex S200 (10/30)-Gelfiltrationssäule der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg.



Linear Regression, Simple weighting
Correlation Coefficient (r) = -0.9998

Variable	Value	Std. Err.
Intercept	4.7290	0.0398
Slope	-0.2273	0.0029

Conditions: 50mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 0.7mL/min flow, 1.5MPa pressure

$$M_W = 10^{(4.729 - 0.2273 \cdot Vel)}$$

8.5 Posttranslationale Modifikationsstellen innerhalb des humanen SGT-Proteins

Die Aminosäuresequenz des hSGT-Proteins wurde mit Hilfe des Programms ScanProsite auf potentielle Modifikationstellen hin untersucht.

PS00008 **MYRISTYL** *N-myristoylation site* :

22 - 27:	GGlsSD
139 - 144:	GNyaGA
166 - 171:	GLalSS
214 - 219:	GGvgSF
249 - 254:	GMisGG
259 - 264:	GTpgTS
262 - 267:	GTspSQ
277 - 282:	GQqfAQ

PS00006 **CK2_PHOSPHO_SITE** *Casein kinase II phosphorylation site* :

46 - 49:	TveD
57 - 60:	TlpE
67 - 70:	TgkE
84 - 87:	SeeD
266 - 269:	SqnD
307 - 310:	SndD

PS00005 **PKC_PHOSPHO_SITE** *Protein kinase C phosphorylation site* :

67 - 69:	TgK
194 - 196:	TyK

PS00007 **TYR_PHOSPHO_SITE** *Tyrosine kinase phosphorylation site* :

174 - 181:	Khv.EavaY

PS00001 **ASN_GLYCOSYLATION** *N-glycosylation site* :

192 - 195:	NETY

8.6 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaare
β	beta
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi (als Präfix)
ca.	zirka
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	desoxy
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxiribonuklease
DNTPs	Desoxynukleotidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetracetat
et al.	*et altera* (lat. und andere)
EtOH	Ethanol
E. coli	Escherichia coli
Fa.	Firma
γ	gamma
g	Erdanziehungskraft
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-pipera-zin-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
k	kilo (als Präfix)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth Medium
M	molar
m	milli (als Präfix)
µ	mikro (als Präfix)
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
n	nano (als Präfix)
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacryamidgel-elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pH	*potentium hydrogenii*
prä-mRNA	Vorläufer-mRNA

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe	*Schizosaccharomyces pombe*
SDS	Natriumdodecylsulphat
sog.	sogenannt
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus* DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'Tetra-Methylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (= Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel